N° d'Enregistrement
au C.N.R.S.
A.O. 6365

THESE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DE PARIS VI - FACULTÉ DES SCIENCES

Quai Saint Bernard

par

Agnès LÉPINAY

pour obtenir le grade de

Docteur es-Sciences naturelles

✳

ETUDE MORPHODYNAMIQUE ET ULTRASTRUCTURALE DE CHLAMYDIA PSITTACI

SOUCHE ORNITHOSIS

✳

soutenue le 15 décembre 1971 devant la Commission d'Examen :

Professeur R. COUTEAUX, *Président*
Professeur P. SCHAEFFER,
Professeur J. ORFILA

A mes parents

A qui je dédie ce travail

Qu'ils trouvent ici l'humble témoignage

de ma reconnaissance et de mon profond attachement

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Monsieur le Professeur Raoul KOURILSKY,

Vous m'avez, en toutes circonstances, prodigué intérêt et encouragements. Puisse ce travail être le témoignage de mon profond respect ainsi que l'expression de mes vifs remerciements.

Il m'est agréable de vous remercier également, Madame Raoul KOURILSKY, pour l'accueil chaleureux que vous m'avez toujours réservé.

Monsieur le Docteur Roger ROBINEAUX,

Dès 1963, vous m'avez intégrée à votre équipe de recherches ; vous m'avez permis de réaliser ce travail dans le service de PHYSIO-PATHOLOGIE CELLULAIRE que vous avez créé. J'ai bénéficié de vos conseils et des possibilités exceptionnelles, notamment techniques, faute desquels ce travail n'aurait pu être effectué.

Je vous exprime ma très vive gratitude.

Mademoiselle le Professeur Jeanne ORFILA,

Vous n'avez cessé de me témoigner votre amitié pendant ces années de travail en commun ; vous avez décidé de l'orientation de mes recherches dans le domaine qui vous était cher, en prodiguant, avec un enthousiasme communicatif, votre enseignement et vos encouragements.

Je ne saurais oublier combien votre présence me fut précieuse et agréable. J'espère ne pas vous décevoir et vous présente cette thèse en témoignage de mon affectueuse reconnaissance.

Je vous exprime ma reconnaissance, Monsieur le Professeur René COUTEAUX, de me faire l'honneur de présider cette thèse.

Monsieur le Professeur Pierre SCHAEFFER, vous avez bien voulu participer à mon jury de thèse : je vous prie de trouver ici l'expression de mes vifs remerciements.

Je ne peux pas oublier la contribution importante de mes amis et collègues du Service de PHYSIO-PATHOLOGIE CELLULAIRE :

Madame Serge ASTESANO et Mademoiselle Jeanne-Marie BOUTRY qui avez participé à l'élaboration de ce travail.

Madame ORME-ROSSELLI et Mademoiselle Any ANTEUNIS qui avez apporté votre concours et votre expérience technique en microscopie électronique.

Monsieur Christian MONCEL, ingénieur cinéaste, dont la compétence et l'infatigable ardeur ont réussi à surmonter les nombreuses difficultés pour réaliser le film qui est à la base de ce travail.

A ses côtés, Monsieur Hervé COET a assuré avec talent les travaux importants de reproduction photographique.

J'adresse à tous l'expression de mon amitié et de ma profonde reconnaissance.

Je veux également remercier mes collègues du Service de Microbiologie d'Amiens, en particulier Madame Jean-Claude LECLERCQ, secrétaire et Mademoiselle Monique VASSEUR.

L'impression définitive de ce mémoire est assurée par Messieurs Pierre et André GENDT (Imprimerie GENDT Frères), avec le concours de Messieurs Jean-Jacques et Philippe LEPINAY. Madame FRAPPART en a assuré la dactylographie.

Je leur exprime toute ma gratitude.

SOMMAIRE

INTRODUCTION 7

1. GÉNÉRALITÉS SUR LES CHLAMYDIACEAE.

1.1. Position taxonomique des Chlamydiaceae et de l'agent de l'ornithose 12
1.2. Morphologie 14
1.3. Ultrastructure 14
1.3.1. Composition de l'inclusion 15
1.3.2. Structure des membranes 16
1.4. Composition chimique 16
1.5. Synthèse des acides nucléiques 19
1.6. Métabolisme 19
1.7. Structure antigénique - Toxicité 21

2. MATÉRIEL ET TECHNIQUES UTILISÉS.

2.1. Cultures cellulaires in vitro 24
2.1.1. Types cellulaires utilisés 24
a) Culture de première explantation 24
b) Culture de souches cellulaires. 24
c) Culture de macrophages péritonéaux 24
2.1.2. Techniques de culture 24
2.2. L'agent de l'ornithose 25
2.2.1. Souche utilisée et modalités d'utilisation 25
a) Méthodes d'inoculation in ovo 25
— Inoculation dans le sac vitellin de l'œuf embryonné 25
— Prélèvement des sacs vitellins infectés 26
b) Méthodes d'inoculation des cultures in vitro . .. 27
— Inoculation des cellules cultivées sur lamelles . 27
— Inoculation des cellules en suspension 27

— Discussion 28
— Obtention d'un inoculum par passages sur cellules. 28
2.2.2. Méthodes de titrage de l'agent infectieux 28
a) Titrage sur œufs 29
b) Titrage sur cellules 29
c) Comparaison des résultats obtenus par ces deux types de titrage 30
— Discussion 30
d) Influence de différents paramètres sur les résultats du titrage 30
— Effet du froid 30
— Influence des passages successifs sur œufs .. 32
2.2.3. Purification de l'agent infectieux 32
— Discussion 35
2.3. Techniques d'étude ultrastructurale 35
2.3.1. La fixation à la glutaraldéhyde 35
2.3.2. La fixation selon Ryter et Kellenberger 35
2.3.3. Inclusions et coupes 35
a) Epon 35
b) Glycolméthacrylate 37
2.3.4. Colorations 37
a) Colorations générales 37
b) Colorations spécifiques 37
— Mise en évidence des polysaccharides 37
— Mise en évidence des glycoprotéines 38
— Digestions enzymatiques 38
— Coloration régressive 38
2.3.5. Microscopie et photographies 39
2.4. Systèmes pour l'observation continue des cultures à l'état vivant 39
2.4.1. Systèmes de montage 39
a) La chambre de Sykes-Moore 39
b) La chambre de Rose 39
— Montage de la chambre 39
— Essai de perfusion 44
2.4.2. Technique microcinématographique 44
2.5. Justification du choix des différentes techniques utilisées .. 47

3. RÉSULTATS.

3.1. Etude morphologique et cytochimique de l'agent infectieux .. 50
— Etude morphologique 50
3.1.1. Cycle de développement intracellulaire 50
3.1.2. Les corps élémentaires 55
3.1.3. Les corps initiaux 58
3.1.4. Les corps intermédiaires 58
3.1.5. Les formations vésiculaires 58
3.1.6. Discussion 61
— Etude cytochimique 63
— Mise en évidence des polysaccharides 67
— Discussion 71
— Etude enzymatique 71
3.2. Etude dynamique à l'aide de la microcinématographie à contraste de phase dans les cellules fibroblastiques 72
3.2.1. Etude des cellules normales 72
3.2.2. Etude des cellules infectées 80
3.2.3. Résultats des enregistrements cinématographiques .. 80
3.2.4. Discussion 93

4. CONCLUSIONS GÉNÉRALES.. 95

5. BIBLIOGRAPHIE 99

6. ANNEXE 107

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550026_0009

INTRODUCTION

L'ornithose est l'appellation attribuée par Meyer (55) en 1940 à des manifestations cliniques bénignes comparables à celles de la psittacose qui laissa, après la grande pandémie de 1929-1930, le souvenir d'une maladie humaine fébrile, suraiguë, à localisation pulmonaire très hautement contagieuse.

Les travaux de Meyer, Eddie, Yanamura (57) et Smadel (86) confirmèrent la distinction entre ces deux infections, non séparables du point de vue de diagnostic mais dont l'une, la psittacose, représente la forme aiguë de la maladie ; elle est transmise uniquement par les Psittacidés. L'autre plus répandue, l'ornithose, est provoquée par un parasite d'autres oiseaux : pigeons, canaris, pinsons (23-39-57-86), hérons (64).

Les relations entre l'agent infectieux de l'ornithose et les cellules-hôtes sont encore fort mal connues. C'est le but du présent travail d'essayer de les préciser.

Nous rappellerons dans un *premier chapitre* les caractéristiques générales du groupe auquel ce micro-organisme appartient : les Chlamydiaceae.

Le *second chapitre* sera consacré aux méthodes d'étude utilisées dont certaines sont originales, comprenant en particulier la culture de tissu, la microcinématographie, la microscopie électronique incluant la cytochimie ultrastructurale.

Grâce à ces méthodes, nous avons pu étudier le cycle de développement de l'agent de l'ornithose et entreprendre l'étude cytologique de cet agent parasite obligatoire de nombreux types cellulaires. L'ensemble des résultats obtenus sera rapporté dans le *troisième chapitre*.

Le *quatrième et dernier chapitre* sera consacré aux conclusions générales.

Certains aspects de ce travail ont fait l'objet de publications figurant en annexe. En voici la liste :

1. ORFILA (J.), LEPINAY (A.) avec la collaboration technique de A. ASTESANO). — Etude du cycle de développement de l'agent de l'ornithose dans les macrophages de souris. Annales de l'Institut Pasteur, **113,** 19-27, 1967.

2. ORFILA (J.), LEPINAY (A.) (avec la collaboration technique de Cl. SPINA). — Etude de l'ornithose expérimentale de la souris blanche infectée par voie intra-péritonéale. Annales de l'Institut Pasteur, **116,** 111-120, 1969.

3. LEPINAY (A.), ANTEUNIS (A.), ORFILA (J.), ROBINEAUX (R.). — Etude morphologique et cytochimique ultrastructurale de l'agent de l'ornithose cultivé dans les macrophages péritonéaux de souris. Journal de Microscopie - Colloque de Lausanne, 1969.

4. LEPINAY (A.), ORFILA (J.), ANTEUNIS (A.), BOUTRY (J.-M.), ORME-ROSELLI (L.), ROBINEAUX (R.). — Etude en microscopie électronique du développement et de la morphologie de Chlamydia psittaci dans les macrophages de souris. Annales de l'Institut Pasteur **119**, 222-231, 1970.

5. LEPINAY (A.), ROBINEAUX (R.), ORFILA (J.), ORME-ROSELLI (L.), BOUTRY (J.-M.). — Ultrastructure et cytochimie ultrastructurale des membranes de Chlamydia psittaci. Archiv Für die Gesamte Virusforschung, **33,** 271-280, 1971.

6. LEPINAY (A.), ROBINEAUX (R.), ORFILA (J.), MONCEL (C.), COET (H.), BOUTRY (J.-M.). — Analyse en microcinématographie à contraste de phase du développement intracellulaire de Chlamydia psittaci. Archiv Für die Gesamte Virusforschung, **35,** 161-176, 1971.

Un film édité et diffusé par le Service du Film de Recherche Scientifique, 96, boulevard Raspail, Paris, accompagne cette thèse pour le doctorat ès sciences naturelles.

I

GÉNÉRALITÉS SUR LES CHLAMYDIACEAE

1.1. POSITION TAXONOMIQUE DES CHLAMYDIACEAE ET DE L'ORNITHOSE

Après la terrible épidémie de psittacose de 1930, les nombreux travaux des microbiologistes permirent de préciser l'étiologie de la maladie. Les agents responsables furent ainsi isolés par Bedson et coll. (13). La même année, Levinthal (48) démontre la présence de corpuscules très petits dans les exsudats et les organes de souris infectées expérimentalement. Il les désigne sous le terme : « Microbacterium multiforme psittacosis ».

Lillie (49), en avril 1930, propose que ces éléments soient dénommés Rickettsia psittaci en raison de leur analogie morphologique avec les Rickettsiales. Bedson et Bland (12) jugent impropre cette appellation, la maladie n'étant pas transmise par l'intermédiaire des Arthropodes. Dans le domaine de la pathologie animale, des micro-organismes de plus en plus nombreux présentèrent les mêmes caractères décrits initialement par Bedson (11) ; citons la méningo-pneumonie, l'encéphalite bovine, l'avortement de la brebis. Ils furent désignés comme des Rickettsiales ou définis comme de « gros virus ». Cette incertitude dans la systématique persista et ces microbes furent communément appelés « agents ». Ce terme est suivi du nom de la maladie qu'ils induisent.

Une meilleure compréhension de la taxonomie fut apportée par Page en 1966 (69). Il sépara définitivement ces agents, possédant deux acides nucléiques, de la classe des virus et les regroupa dans un vaste ensemble : les Chlamydiaceae, infectant aussi bien les mammifères dont l'homme que les oiseaux (tableau 1).

TABLEAU 1

Agents les plus importants du groupe de la psittacose selon Moulder (61)

Agents des oiseaux	*Agents de l'homme*
Psittacose	Lymphogranulomatose vénérienne
Ornithose	Trachome
	Conjonctivite à inclusions
	Pneumonie humaine

Agents des mammifères

Méningo-pneumonie	Entérite bovine
Pneumonie de la souris	Encéphalite bovine
Pneumonie des félins	Avortement de la brebis
	Pneumonie des moutons

A l'intérieur du groupe, ces agents, très nombreux, furent d'abord classés selon l'hôte d'origine et le type de pouvoir pathogène qu'ils induisaient (47).

TABLEAU 2

Sous-groupes des souches PLT sur la base de la morphologie des inclusions, de la présence de glycogène et de la sensibilité à différents antibiotiques ou antagonistes d'après Gordon et Quan

	AGENTS	NATURE DE L'INCLUSION		Sensibilité à la sulfadiazine	Sensibilité à la *D* cyclosérine	Effet de la *D* alanine antagoniste de la *D* cyclosérine
		morphologie	Présence de glycogène			
Sous-groupe *A*	Trachome	C (1)	+	+	+ + +	+
	Lymphogranulomatose vénérienne	C	+	+	+ + +	+
	Conjonctivite à inclusions	C	+	+	+ + +	+
	Pneumonie de la souris	C	+	+	+ + +	+
	Pneumonie du hamster	C	+	+	+ + +	+
Sous-groupe *B*	Méningo-pneumonie	D (2)	0	0	+	+ + +
	Pneumonie des félins	D	0	0	+	+ + +
	Conjonctivite du cobaye	D	0	0	+	+ + +
	Ornithose pigeon	D	0	0	+	+ + +
	Psittacose (6BC)	D	0	+	+	+ + +
	Encéphalomyélite bovine	D	0	0	+ +	+ +

(1) - C = Compacte.

(2) - D = Diffuse et irrégulière.

On a ainsi distingué deux groupes :

— le groupe ornithose-psittacose dans lequel sont rangés de nombreux agents de maladies des animaux (agents de l'avortement de la brebis, de la méningo-pneumonie de la souris, du hamster et du chat, de l'entérite des bovins, de l'encéphalite des bovins, de l'ornithose et de la psittacose). L'homme est un chaînon épidémique le plus souvent accidentel ;

— le groupe des agents du trachome, de la conjonctivite à inclusions (TR. I.C.) et de la lymphogranulomatose vénérienne, parasites stricts de l'homme. Toutefois, les seuls critères pathologiques ne permirent pas d'identifier et de différencier toutes les souches. Les études antigéniques utilisant les techniques de mise en évidence de la liaison antigène-anticorps : fixation du complément, neutralisation, immunofluorescence apportèrent des résultats qui n'étaient pas en concordance avec cette première classification. D'autres caractères morphologiques et biochimiques complétèrent cette étude systématique : morphologie ultrastructurale de l'inclusion, élaboration de glycogène au cours de la vie intracellulaire, action des sulfamides.

Ainsi nous distinguerons actuellement deux sous-groupes *A* et *B* selon la classification de Gordon et Quan (tableau 2).

1.2. MORPHOLOGIE

Les Chlamydiaceae sont des germes immobiles dont la taille varie de 0,250 μ à 1 μ. Ils ne prennent pas le Gram et sont facilement mis en évidence par les colorants basophiles (Giemsa-Macchiavello ou Castañeda).

Parasites intracellulaires obligatoires (61), ils se développent selon un cycle complexe, à l'intérieur du cytoplasme de la cellule-hôte. Cette évolution aboutit à la formation d'une véritable « colonie bactérienne » : l'inclusion. Celle-ci présente en microscopie à lumière un aspect qui pourrait varier en fonction, à la fois, de l'agent infectant et de la cellule-hôte (37, 65). Elle serait diffuse pour l'agent de la psittacose et de l'ornithose, compacte pour l'agent du trachome.

1.3. ULTRASTRUCTURE

Les études ultrastructurales ont été effectuées sur de nombreux agents du groupe : de la méningo-pneumonie (28, 42), de la lymphogranulomatose vénérienne (4), du trachome (5, 41, 50, 58), de la psittacose (40, 34, 88), de l'ornithose (1, 43, 73).

Les résultats de ces travaux ont permis de mieux connaître le cycle d'évolution de ces agents dans la cellule-hôte, de préciser la structure de l'inclusion, d'établir la constitution des éléments. Nous soulignerons ici deux points importants :

1.3.1. **Composition de l'inclusion**

Les Chlamydiaceae présentent au stade final de développement, à l'intérieur d'une vésicule, une population hétérogène comprenant trois types de particules :

— le *corps élémentaire* dont la taille varie entre 250 mμ et 350 mμ, présentant trois zones :
  — un nucléoïde dense aux électrons,
  — un réseau fibrillaire plus ou moins large,
  — une zone bordante granuleuse constituée par des ribonucléoprotéines ;

— le *corps intermédiaire* de 450 mμ environ est comparable au corps élémentaire, mais le nucléoïde est central ;

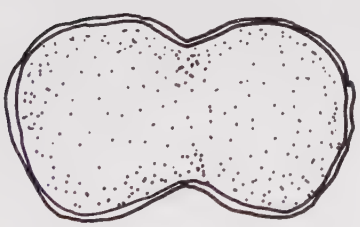
— le *corps initial* pouvant atteindre 1 μ, ne possédant pas de nucléoïde mais des structures granuleuses et fibrillaires.

Certains corps initiaux plus allongés présentent une constriction médiane, pouvant signifier une division par fission binaire, rappelant celle des bactéries (61).

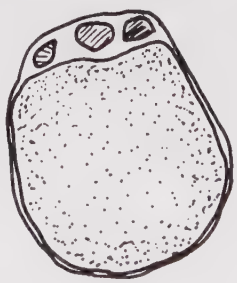
Certains auteurs ont cependant montré des images évoquant une multiplication par endosporulation (34).

Le mode de reproduction de l'agent est un problème non encore résolu. Les différentes possibilités de division étant résumées ainsi :

— *Fission* (cas général),
— *Endosporulation*.



MULTIPLICATION par FISSION



ENDOSPORULATION

1.3.2. **Structure des membranes**

Le corps initial possède deux membranes de type « unit membrane ». Elles sont fragiles et très perméables aux molécules. Le corps élémentaire présenterait, outre une membrane cytoplasmique, une véritable paroi. La partie interne de cette paroi montrerait un arrangement géométrique de structure de 100 Å de diamètre et la partie externe serait granuleuse (52, 54).

Les antibiotiques, en particulier la pénicilline G et la D cyclosérine, inhibent la synthèse de la muréine présente dans la paroi du corps élémentaire. Tribby (97) a montré que, lors de la maturation du corps initial en corps élémentaire, les sous-unités peptidiques du « cell wall » constituent un réseau, par formation de liaisons nouvelles. C'est ce phénomène de « cross linkage », support de la rigidité de la paroi du corps élémentaire, qui serait inhibé par la pénicilline G (97).

1.4. **COMPOSITION CHIMIQUE**

Jenkin (44) avait déjà tenté en 1960 d'isoler les membranes de l'ensemble des particules constituant la population de l'agent de la méningo-pneumonie, par traitement par le déoxycholate et la trypsine. Il en avait extrait différents acides aminés, 9 ou 10, de l'hexosamine, des sucres, des phospholides en grande quantité et des traces d'acides nucléiques. Les techniques d'isolement des différentes particules, mises au point par Tamura et Higashi pour l'agent de la méningo-pneumonie (90), ont grandement facilité l'étude de la composition chimique des divers éléments constitutifs de cette population microbienne. Ces auteurs ont ainsi dressé la liste des composants chimiques des corps élémentaires et des corps initiaux (tableau 3). De leur côté, Manire et Tamura (53) ont comparé la composition chimique des corps élémentaires à celle de leurs membranes (tableau 4). Une même étude comparative a été faite par ces auteurs, portant sur la composition en acides aminés des membranes isolées, respectivement de l'agent de la méningo-pneumonie, d'un streptocoque et d'Escherichia coli. (tableau 5). Perkins et Allison (71) ont signalé la présence d'acide muramique dans la membrane du corps élémentaire de l'agent de la méningo-pneumonie. Par contre, en 1967, Manire et Tamura (53) ont confirmé ce résultat. Il ressort de ces observations que la composition exacte de la membrane du corps élémentaire de l'agent de la méningo-pneumonie n'est pas encore connue.

Les éléments du groupe Chlamydiaceae possèdent à la fois les deux acides nucléiques. D'après Tamura et coll. (90), leur répartition dans les diverses particules du cycle de développement n'est pas la même : la quantité d'ARN par rapport à celle d'ADN est plus importante dans le corps initial à l'inverse de ce qui se passe pour le corps élémentaire (tableau 3). Pollard et Tanami (74) avaient déjà montré par la coloration à l'acridine orange que des cellules infectées montrent au stade des corps initiaux une formation,

TABLEAU 3

Répartition du phosphore 32 radioactif dans les préparations purifiées de corps élémentaires et de corps initiaux de l'agent de la méningo-pneumonie

(Extrait de Réf. 91)

FRACTIONS	CORPS ÉLÉMENTAIRES		CORPS INITIAUX	
	Coups/mn	Distribution	Coups/mn	Distribution
		%		%
Particules entières .	48,500		28,200	
Fraction acido-soluble	3,500	7,22	2,210	7,82
Lipides	15,490	31,5	6,650	23,6
RNA	13,300	27,4	14,550	51,6
DNA	12,900	26,6	3,800	13,5
Fraction résiduelle .	1,980	4,07	504	1,79

TABLEAU 4

Répartition du phosphore 32 radioactif dans les fractions des particules et des membranes de l'agent de la méningo-pneumonie

(Extrait de Réf. 53)

FRACTIONS	CORPS ÉLÉMENTAIRES		MEMBRANES PURIFIÉES	
	Coups/mn × 1000	Distribution	Coups/mn × 1000	Distribution
		%		%
Exp. n° 1 :				
Lipides	1,210	37,4	34,4	80,2
RNA	917	28,4	2,8	6,5
DNA	834	25,8	2,8	6,5
TOTAL	3,230		42,9	
Exp. n° 2 :				
Lipides	3,150	40,2	107,0	75,7
RNA	2,060	26,3	9,7	6,8
DNA	1,990	25,4	11,0	7,8
TOTAL	7,840		127,7	

TABLEAU 5

Composition en acides aminés des corps élémentaires et de leurs membranes de l'agent de la méningo-pneumonie. Comparaison avec les constitutions des membranes de streptocoques et d'E. coli (a)

(Extrait de Réf. 53)

ACIDES AMINES	MÉNINGO-PNEUMONIE		Membrane de streptocoques	Membranes d'E. Coli
	Particules corps élémentaires	Membranes des corps élémentaires		
Alanine	9,6	9,9	57,5	13,1
Arginine	4,1	3,7	—	4,6
Acide aspartique ..	10,1	12,2	2,9	11,1
Acide glutamique ..	9,4	8,7	15,2	9,8
Glycine	8,9	9,1	2,1	8,6
Cystine	1,6	4,1	—	—
Histidine	1,8	1,3	—	1,2
Isoleucine	5,0	3,6	0,9	5,9
Leucine	8,0	6,4	1,4	8,5
Lysine	7,9	5,4	15,0	5,7
Méthionine	1,8	1,0	—	1,0
Phénylalanine	3,8	3,8	0,8	3,8
Proline	5,2	6,6	—	2,7
Sérine	8,0	9,4	1,7	7,4
Thréonine	6,6	7,6	1,7	6,7
Tyrosine	2,6	3,0	0,8	3,8
Valine	5,2	4,2	—	6,1

(a) Les résultats sont exprimés en micromoles % du montant total en acides aminés.

colorée en rouge, sensible à la ribonucléase. Par contre, l'inclusion finale, composée essentiellement de corps élémentaires, apparaît colorée en vert, du fait de la prédominance de l'ADN.

L'ARN du corps initial présente trois composantes de sédimentation : 21 S, 16 S, 4 S, avec une prédominance de 21 S et 16 S (85). Pour Tamura (89), les corps initiaux et élémentaires contiennent des ribosomes. Les analyses de Sarov et Becker pour l'agent du trachome (84) ne permettent pas de conclure à la présence de ribosomes, mais seulement de sous-unités ribosomales. A l'aide de la microscopie électronique, Tamura et coll. pour l'agent de la méningo-pneumonie (91) et Anderson pour l'agent de l'ornithose (1) ont confirmé l'existence de ces ribosomes.

Sarov et Becker (83) ont donné les caractéristiques du « chromosome » de l'agent du trachome : son poids moléculaire est de 660×10^6 daltons en moyenne ; sa conformation est linéaire ; il possède une longueur moyenne de 342,5 $m\mu$. Il serait plus grand que le chromosome des Mycoplasmes et se rapprocherait de celui d'Hémophilus influenzae.

1.5. SYNTHÈSE DES ACIDES NUCLÉIQUES

Elle est localisée dans l'inclusion, comme l'a montré Bernkopf et coll. (18) à l'aide de l'uridine et de la thymidine tritiées dans les cellules FL infectées par l'agent du trachome.

Tanami et Pollard (92), travaillant sur des cellules Mac Coy d'origine synoviale infectées par l'agent de la psittacose, ont montré, à l'aide d'analogues métaboliques, que la synthèse d'ADN précède de 10 heures la formation des corps élémentaires. Celle d'ARN est plus tardive et survient seulement 2 à 3 heures avant.

Cette synthèse d'acides nucléiques semble indépendante des synthèses de la cellule-hôte : Crocker et Eastwood (26) ont montré que la multiplication de l'agent de la psittacose est possible dans des fragments anuclés. Cette idée est renforcée par le fait que l'acide folique coenzyme de la synthèse de l'acide thymidilique est un constituant normal des Chlamydiaceae (25). Il existerait cependant une relation entre le parasite et le métabolisme de la cellule-hôte : d'après Crocker et coll. (27), la multiplication intracellulaire de l'agent de l'ornithose retarderait la synthèse d'acides nucléiques dans le noyau de la cellule-hôte (cellule HeLa). Ceci correspondrait dans le parasitisme à une compétition pour l'utilisation des métabolites à haut rendement énergétique.

1.6. MÉTABOLISME

L'étude des besoins nutritifs est rendue difficile par l'existence du parasitisme obligatoire. Bader et Morgan (6) établirent les besoins nutritionnels

minima requis pour la multiplication de l'agent de la psittacose (6 BC) dans les cellules L : dans ces cellules maintenues en survie dans une solution saline contenant seulement du glucose, l'agent de la psittacose ne se multiplie pas. Si le milieu est enrichi en acides aminés, le parasite peut reprendre son développement normal. L'étude de l'influence de la composition du milieu de culture permit de montrer qu'un acide aminé non exigé par la cellule-hôte n'est pas davantage nécessaire au germe. De plus, quatre acides aminés et deux vitamines essentiels à la cellule L ne seraient pas indispensables au développement de l'agent de la psittacose. Il s'agit de l'arginine, l'histidine, la lysine, la glutamine et pour les vitamines de l'acide folique et de la riboflavine (67).

De ces quatre acides aminés, l'histidine et l'arginine sont presque ou totalement absents des protéines des Chlamydiaceae.

Si la psittacose n'a pas d'exigence vis-à-vis de certains acides aminés, d'autres agents infectieux du même groupe sont en position différente. Un milieu dépourvu d'arginine, d'histidine, de lysine empêche la multiplication de la lymphogranulomatose vénérienne. Quant à l'agent du trachome, la sérine augmenterait fortement son taux de multiplication (67, 96).

Les Chlamydiaceae catabolisent le glucose. L'étude de ce métabolisme posa de nombreux problèmes. Dans sa revue générale sur le groupe Psittacose, Moulder (61) décrit ces organismes comme des parasites intracellulaires obligatoires en ce qui concerne les liaisons à haut rendement énergétique, indispensables à toute synthèse métabolique. Kuwata et Shiba (45) montrèrent l'influence de ce métabolite sur la croissance de l'agent de l'ornithose. A la suite des travaux d'Ormsbee et coll. (66), Weiss (99) puis Moulder (62) recherchèrent pour différents agents du groupe PLT les enzymes impliqués dans les réactions cataboliques productrices de liaison à haut rendement énergétique.

Ces différents résultats montrent que ce catabolisme n'est pas générateur d'énergie. Le besoin en ATP exogène est une dépendance totale de l'agent vis-à-vis de la cellule-hôte. Ce caractère n'existe jamais à ce degré chez les bactéries ni les rickettsies.

Cette notion de parasitisme obligatoire a été récemment renforcée par les travaux d'Arcy Gill et coll. (2, 3). L'infection par un agent Chlamydiaceae se manifeste dans la cellule-hôte par une consommation accrue de glucose, par une augmentation de la respiration cellulaire, ce qui correspond à une phosphorylation oxydative accélérée. Le transfert de métabolites à haut rendement énergétique de la cellule-hôte à l'agent infectieux pose le problème de la perméabilité à ces molécules. Le corps initial, particule de synthèse, limitée par deux « unit membranes » fines et fragiles, semble posséder de telles propriétés.

Un autre métabolisme, celui du glycogène, n'est pas encore élucidé. En effet, certains types de Chlamydiaceae présentent une accumulation de glycogène à l'intérieur de l'inclusion. Cette particularité a permis de distinguer deux sous-groupes :

— le groupe *A* des agents qui synthétisent le glycogène et dont l'inclusion est colorée par le PAS (PAS +), groupe TRIC ;

— le groupe *B* des agents est négatif (PAS —), groupe Psittacose.

En 1936, Rice (76), le premier, avait parlé de la nature glycogénique de la « matrice » du trachome. Ce glycogène pouvait provenir de l'agent infectieux ou correspondre à une réaction de la cellule-hôte. Gordon et Quan ont pensé qu'il s'agissait d'une synthèse propre aux Chlamydiaceae : dans les cellules Mac Coy, le glycogène apparaissait pour un groupe (TRIC) et non pour l'autre (Psittacose). L'apparition et la disparition du glycogène étaient liées au cycle de développement de l'agent infectieux. La pénicilline arrêtant la multiplication du germe inhibait la production de glycogène.

Récemment, Fan et Jenkin (29), à l'aide du glucose C_{14} marqué, ont étudié comparativement la courbe de synthèse du glycogène dans les cellules HeLa normales et dans les cellules HeLa infectées par l'agent du trachome (groupe PAS +) ou celui de l'agent de la méningo-pneumonie (groupe PAS —). Après une baisse identique dans les 48 premières heures de l'infection, l'accumulation du glycogène est très importante dans les cellules infectées par l'agent du trachome, moindre dans les cellules normales, et décroît rapidement dans les cellules infectées par l'agent de la méningo-pneumonie. Ces résultats tendent à montrer que, dans des cellules contenant normalement du glycogène, l'agent infectieux peut entraîner une déviation du métabolisme de celui-ci.

La synthèse des lipides serait limitée à celle des phospholipides et particulièrement des composants phosphatidyl-éthanolamine (33).

La synthèse des protines n'est pas connue (101). En 1967, Tamura isolait à partir des corps initiaux de la méningo-pneumonie des particules 70 S qu'il identifia à des ribosomes (91). Ces micro-organismes pourraient donc synthétiser leurs propres protéines.

1.7. STRUCTURE ANTIGÉNIQUE - TOXICITÉ

La composition antigénique est complexe : Bedson en 1936 (10) et Barwell en 1952 (9) ont montré qu'il existait deux antigènes : l'un de groupe dont les anticorps correspondants réagissent avec tous les membres du groupe, les autres spécifiques d'espèce dont les anticorps réagissent seulement avec l'espèce considérée.

L'antigène de groupe est stable à la chaleur ; il est présent dans les extraits phénolés de sacs jaunes infectés, soluble dans l'éther, extrait par le déoxycholate et la trypsine. C'est un complexe protéo-lipopolysaccharide, inactivé par le périodate. Les antigènes spécifiques d'espèces ont été localisés dans les préparations de membranes (44). Ils sont résistants au périodate. Ils sont masqués par l'antigène de groupe. Comme celui-ci, ils sont associés aux réactions de fixation du complément, de neutralisation. Leur extraction est difficile.

Certains membres des Chlamydiaceae (36, 104), telle l'agent de la psittacose, possèdent une hémagglutinine capable d'agglutiner seulement les érythrocytes de souris. Barron et coll. (8) ont montré que l'hémagglutinine de l'agent de la psittacose pouvait réagir avec les érythrocytes de poulet, mais seulement de certaines races, celles dont les hématies sont capables de s'agglutiner en présence de l'hémagglutinine de la vaccine. Cette hémagglutinine de l'agent de la psittacose présente des réactions croisées avec tous les agents du groupe PLT, comme l'ont montré Riera et Barron (77) utilisant à cet effet le test de double diffusion en gel d'Agar. Pour la méningo-pneumonie, Parikh et Schechmeister rapportent la présence d'une leucoagglutinine (70).

TOXICITÉ

Les Chlamydiaceae montrent une forte toxicité pour l'œuf de poule, la souris (35, 56, 79).

Taverne, Reeve et Blyth (93) ont étudié comparativement les variations de virulence et de toxicité de différentes souches de l'agent du trachome. Christoffersen et Manire (22) ont montré qu'on peut absorber totalement l'antitoxine de l'agent de la méningo-pneumonie contenue dans un sérum de lapin hyper-immun par des corps élémentaires purifiés. Ils en déduisent que cette toxine est localisée sur les membranes de cette particule. Par contre, les corps initiaux ne posséderaient aucune toxicité pour la souris. Le mécanisme de cette toxicité n'est pas connu.

II

MATÉRIEL ET TECHNIQUES UTILISÉES

En fonction du but que nous nous étions proposés, nous avons été amenés à comparer diverses techniques dont certaines nécessitèrent une plus grande mise au point. Nous donnerons dans ce chapitre l'ensemble des expériences ainsi menées et discuterons les raisons de notre choix.

2.1. CULTURES CELLULAIRES IN VITRO

2.1.1. Types cellulaires utilisés

a) *Culture de première explantation*

Nous avons cultivé des fibroblastes d'embryons de poulet, prélevés aux 9e-10e jours d'incubation et opéré suivant deux modalités :

— Nous découpons dans le muscle des pattes des explants de 1 mm de côté.

La migration cellulaire a lieu 24 heures après la mise en culture ;

— nous prélevons les muscles des pattes et les écrasons dans la presse Fischer, ou à l'aide d'une seringue, pour obtenir par dilacération une suspension cellulaire.

b) *Culture de souches cellulaires*

Nous avons utilisé différentes souches cellulaires : les cellules ERK, HeLa, KB, de type épithélial ; les cellules $BHK_{21}C_{13}$ et les cellules L de type fibroblastique et des cellules diploïdes humaines W_{38}.

c) *Culture de macrophages péritonéaux de souris*

Prélevés par lavage de la cavité péritonéale de l'animal âgé d'environ 2 mois. Il s'agit d'une technique voisine de celle qu'a préconisée Chang (21) et que Fauve (30) a mise au point : les souris sont tuées par écrasement cervical et attachées sur le dos, la peau abdominale est incisée suivant la ligne médiane et rabattue sur le thorax. On introduit alors stérilement et vigoureusement dans la cavité péritonéale 5 cc de milieu de prélèvement à l'aide d'une seringue à biseau court (12/10). On recueille successivement et stérilement le liquide de lavage des cavités péritonéales des différentes souris. Le mélange est placé dans une fiole à + 4 °C. On répartit la suspension cellulaire à raison de 5 à 7.10^5 cellules par millilitre dans les tubes de Leighton, à raison de 2 ml par tube. Les tubes sont saturés à l'aide d'un mélange de gaz carbonique et d'air (CO_2 5 %, air 95 %). Après 2 jours d'étuve à 37°, le milieu de prélèvement est remplacé par le milieu d'entretien.

Le milieu de prélèvement est constitué par du milieu semi-synthétique 199 Parker auquel sont ajoutés 10 % de sérum de veau sans antibiotique, 5 U/ml d'héparine sans antiseptique, 50 μg/ml de streptomycine. Le pH est ajusté à 6,8. Le milieu d'entretien est identique, mais ne contient pas d'héparine.

2.1.2. Techniques de culture

Les cellules sont cultivées :

a) en flacons de 90 cc et 250 cc, à parois latérales plates ;
b) en tubes Leighton sur des lamelles de verre 12 × 32 mm ;

c) en boîtes de Pétri sur des lamelles rondes de 22 mm de diamètre. Les boîtes de Pétri sont disposées dans une enceinte à air CO_2 (5 % en CO_2) (caisson type Lwoff) placée à 37 °C.

Ces lamelles seront ensuite montées dans la chambre de Sykes-Moore.

Les milieux varient selon le type cellulaire : pour les cellules de souche continue, nous avons utilisé soit le milieu semi-synthétique de Parker, soit le milieu à l'hydrolysat de caséine additionné de 10 % de sérum de veau. Pour les souches cellulaires en culture semi-continue, telles les $BHK_{21}C_{13}$, le milieu est celui de Eagle, additionné de 20 % de sérum de veau. Ce milieu est également utilisé pour les cellules L, mais il est supplémenté en acides aminés, la concentration est double de celle du milieu normal. La streptomycine seule est ajoutée dans tous les cas à la concentration de 50 μg/ml.

2.2. L'AGENT DE L'ORNITHOSE

Il a été isolé à partir d'un pigeon atteint d'ornithose. Il nous a été fourni par le Professeur Dekking de l'Institut d'Hygiène d'Amsterdam. Il est entretenu au laboratoire soit par passages successifs dans le sac vitellin d'œufs de poule embryonnés de 5 jours et prélevés à la mort de l'embryon, soit par passages sur cultures cellulaires.

2.2.1. Souche utilisée et modalités d'utilisation

a) *Méthodes d'inoculation in ovo*

— *Inoculation dans le sac vitellin de l'œuf embryonné*

Les œufs incubés à 39° sont mirés. La chambre à air repérée et placée vers le haut. Après avoir soigneusement nettoyé à l'alcool iodé la coquille, celle-ci est percée à l'aide d'une pointe au pôle de la chambre à air. L'inoculation de 0,3 ml de suspension infectieuse diluée ou non dans le Hanks est injectée à l'aide d'une seringue munie d'aiguille fine (30/7) enfoncée verticalement à une profondeur de 2,5 cm environ.

Les trous sont hermétiquement fermés à l'aide d'un ruban scotch et les œufs sont remis à l'étuve à 36 °C.

Les œufs sont alors mirés tous les jours. La mort de l'embryon survient en général aux alentours du 3^e-4^e jour pour un inoculum non dilué. La mort survenue dans les premières 48 heures est attribuée à une contamination ou à un traumatisme, et les œufs sont éliminés.

— *Prélèvement des sacs vitellins infectés*

L'œuf est placé sur un support. A l'aide de pinces stériles, la coquille préalablement stérilisée à l'alcool iodée est ôtée, en évitant l'émiettement. La membrane coquillière est détachée avec des pinces stériles. L'embryon est repéré et le sac vitellin saisi près du hile. Rapidement, l'ensemble de la membrane vitelline est extraite. Le sac est déposé dans un petit flacon (10 cc) bouché hermétiquement. On a soin de garder un petit fragment de sac vitellin pour effectuer :

— une imposition sur gélose sang ;

— un frottis sur lame histologique.

La gélose sang fournira dans les 24 heures suivantes le contrôle bactériologique. Le flacon est ensuite placé à — 20° pour la conservation de la souche.

Le frottis coloré par le Castañeda permet une évaluation du nombre de particules infectieuses.

COLORATION DE CASTANEDA

Réactifs

a) *Solution tampon*

— Phosphate monopotassique	1 g
— Eau distillée	100 ml
— Phosphate disodique + 12 H_2O	1 g
— Eau distillée	100 ml

b) *Colorant*

— Azur de méthylène	1 g
— Alcool méthylique	100 ml

Préparation de la solution de Castaneda

— Solution tampon (a)	20 ml
— Formol neutralisé	1 ml
— Colorant (b)	0,15 ml

Safranine

— Safranine à 0,2 % dans de l'eau distillée	1 V
— Acide acétique 0,1 %	3 V

Colorer les frottis non fixés avec la solution Castañeda pendant 3 minutes.

Rejeter le colorant et, sans lavage, différencier avec la Safranine pendant 5 secondes. Rincer à l'eau courante.

OBSERVATION

Après coloration, les Chlamydiaceae sont colorées en bleu sur fond rose.

b) *Méthodes d'inoculation des cultures in vitro*

— *Inoculation des cellules cultivées sur lamelles*

L'inoculation des cellules peut s'exécuter directement dans le tube de Leighton ou la boîte de Pétri, comme ceci est couramment utilisé en techniques virologiques. Nous n'avons pas toujours obtenu une répartition homogène de l'inoculum ; en effet, le liquide infectieux surmontant les cellules glisse par capillarité sous la lamelle de verre du tube Leighton. Nous avons donc préféré la technique d'inoculation suivante :

La lamelle est extraite stérilement du tube ou de la boîte de Pétri. Elle est disposée sur un chevalet de verre, à l'intérieur d'une petite enceinte humide. Après avoir déposé l'inoculum (0,1 ml/lamelle), les cellules sont placées à 37° pendant une heure. Après rinçage à l'aide de la solution de Hanks, les lamelles sont remises stérilement dans les tubes, puis recouvertes par le milieu d'entretien approprié. Dans ce cas, la répartition des inclusions dans les cellules est meilleure, la reproductibilité des expériences plus grande. De plus, nous n'utilisons que de faibles quantités d'inoculum.

— *Influence de la durée d'incubation et de la température*

Nous avons fait varier les temps de contact et la température durant l'incubation. Nous notons un meilleur rendement lorsque l'incubation se prolonge au-delà d'une heure à l'étuve à 37°.

Temps de contact	Pourcentage du nombre de cellules parasitées sur des lames prélevées a 48 heures d'infection	
	à 37 °C	à température ambiante
1/2 heure	8 %	21 %
1 heure	37 %	20 %
2 heures	50 %	32 %
3 heures	57 %	14 %

— *Inoculation des cellules en suspension*

Les cellules sont comptées et diluées à la concentration de 4×10^5 cellules par ml. Le contact infectieux se fait dans une fiole contenant 1 ml

de la suspension de l'inoculum à 37° pendant une heure sous légère agitation. Les cellules sont ensuite rincées avec la solution de Hanks et centrifugées à 1 000 t/mn pendant 5 mn. Le culot est remis en suspension et les cellules sont réparties dans des tubes ou autre système de culture, tel la chambre de Rose.

DISCUSSION

Ce processus d'inoculation s'est révélé d'un rendement hautement infectieux : 80 % des cellules sont parasitées. De plus, cette technique nous a permis de suivre l'évolution des cellules dès leur inoculation. Toutefois, il s'est avéré indispensable de laisser reposer la chambre une heure à 37° après le montage, afin de permettre une bonne adhérence des cellules à la lamelle de verre, condition de leur bonne multiplication.

— *Obtention d'un inoculum par passages sur cellules*

Nous avons également entretenu la souche par passage sur cellules après chaque 72e heure d'infection.

Les cellules utilisées furent les cellules de souche continue HeLa et L, ces dernières sont plus sensibles aux Chlamydiaceae et donnent un meilleur rendement.

Les cellules à la 72e heure sont successivement congelées et décongelées, centrifugées à 1 500 t/mn pendant 5 mn et le surnageant constitue l'inoculum. Nous avons conjointement soumis les cellules à des ultrasons (10 kc pendant 2 mn), selon la technique utilisée par Furness et coll. (32) pour l'agent du trachome, et avons facilité la libération des particules infectieuses hors des cellules dans le milieu de culture. Après centrifugation, on prélève stérilement la suspension virulente. Cet inoculum a l'avantage d'être indemne de tout matériel lipidique et facilite l'observation des cellules infectées.

2.2.2. **Méthodes de tirage de l'agent infectieux**

Différentes méthodes de filtration ont été proposées.

Le titre infectieux des Chlamydiaceae peut être exprimé in ovo par la dose léthale 50 %. Collier et coll. (24) en signalèrent les irrégularités tenant à la fois de l'état saisonnier de la sensibilité des œufs, à la difficulté de cultiver certaines souches de l'agent du trachome ; en particulier, ces auteurs constatent qu'une forte dose infectante inhibe le développement de l'infection.

En culture cellulaire, le titre s'exprime par le pourcentage du nombre d'inclusions. Weiss et Huang (100) les premiers utilisèrent cette méthode pour l'agent de la pneumonie du chat. Furness, Graham et Reeve (32)

obtinrent des résultats reproductibles pour l'agent du trachome et de la conjonctivite à inclusions cultivées sur cellules HeLa.

Bernkopf adapte la méthode virologique des plages de lyse à la culture des agents TRIC sur cellules BCS_1 (16). Une relation linéaire existe entre le nombre de plages et la concentration de l'agent. Piraino et coll. (72) utilisèrent la même technique pour l'agent de la psittacose sur fibroblastes de poulet.

Récemment, Bang et coll. (7) l'appliquent à de nombreuses souches de Chlamydiaceae cultivées sur différents types cellulaires. Ils montrent que la cellule L présente la meilleure sensibilité. Le diamètre des plages et leur aspect varient selon les souches de Chlamydiaceae. Il n'existe pas de relation entre le diamètre des plages et la virulence pour l'œuf ou la souris.

Nous avons déterminé le titre infectieux :

a) *par titrage sur œufs*

Nous avons utilisé la culture sur œuf et exprimé le titre par le calcul de la dose selon la méthode de Reed et Muench (78). A partir d'un inoculum préparé par broyat d'un sac vitellin infecté, dont le poids est d'environ 0,450 g, nous effectuons des dilutions de 10^{-1} à 10^{-8}. Le calcul de la LD 50 donne une valeur moyenne de $10^{-6,5}$. A partir d'un surnageant de culture infecté depuis 72 heures, les résultats trouvés permettent d'évaluer la LD 50 à environ $10^{-4,5}$.

b) *par titrage sur cellules*

Le titrage sur cellules est exprimé par le nombre de cellules parasitées, à la 72e heure d'infection. Pour différentes dilutions d'un inoculum à partir de sac vitellin infecté, nous avons trouvé les résultats suivants (tableau 6).

TABLEAU 7

Comptage des inclusions à + 72 heures sur cellules HeLa

DILUTIONS	NOMBRE D'INCLUSIONS SUR 500 CELLULES (5 LAMES)					MOYENNE
1/1	54	35	57	35	46	45,4
1/2	64	43	31	34	51	44,6
1/4	28	35	15	21	28	25,4
1/8	16	14	15	10	8	12,6
1/10	16	15	8	6	13	11,6
1/20	9	2	1	5	2	3,8
1/40	2	1	2	2	3	2
1/80	0	1	0	0	0	0,2
1/100	2	1	4	1	1	1,8
1/140	0	0	1	1	4	1,2
1/200	0	0	0	1	1	0,4

c) *Comparaison des résultats obtenus par ces deux types de titrages*

Nous avons essayé de comparer les deux techniques. Pour cela, le même inoculum (à partir de sac vitellin d'œuf infecté) a été titré sur œuf et parallèlement sur cellules. Les résultats sont donnés dans le tableau 7.

TABLEAU 7

	Titrage sur œufs Expression de la LD 50	Titrage sur cellules exprimé par le nombre de cellules parasitées (x)
Exp. 1	10^{-7}	91 (x)/500 cellules
Exp. 2	$10^{-6,8}$	81 (x)/500 cellules

DISCUSSION

Le titrage sur œufs est certainement la technique la plus sensible. Les dilutions 10^{-7}-10^{-8} de l'inoculum peuvent fournir des résultats significatifs. Dans le cadre de nos expériences, nous avons adopté la technique de titration sur cellules. Sa réalisation est rapide et permet une lecture facile des résultats.

d) *Influence de différents paramètres sur les résultats du titrage*

— *Effet du froid*

L'inoculum (obtenu à partir de sacs vitellins infectés) conservé à + 4 °C perd rapidement de sa virulence comme le montre les tableau et courbe suivants :

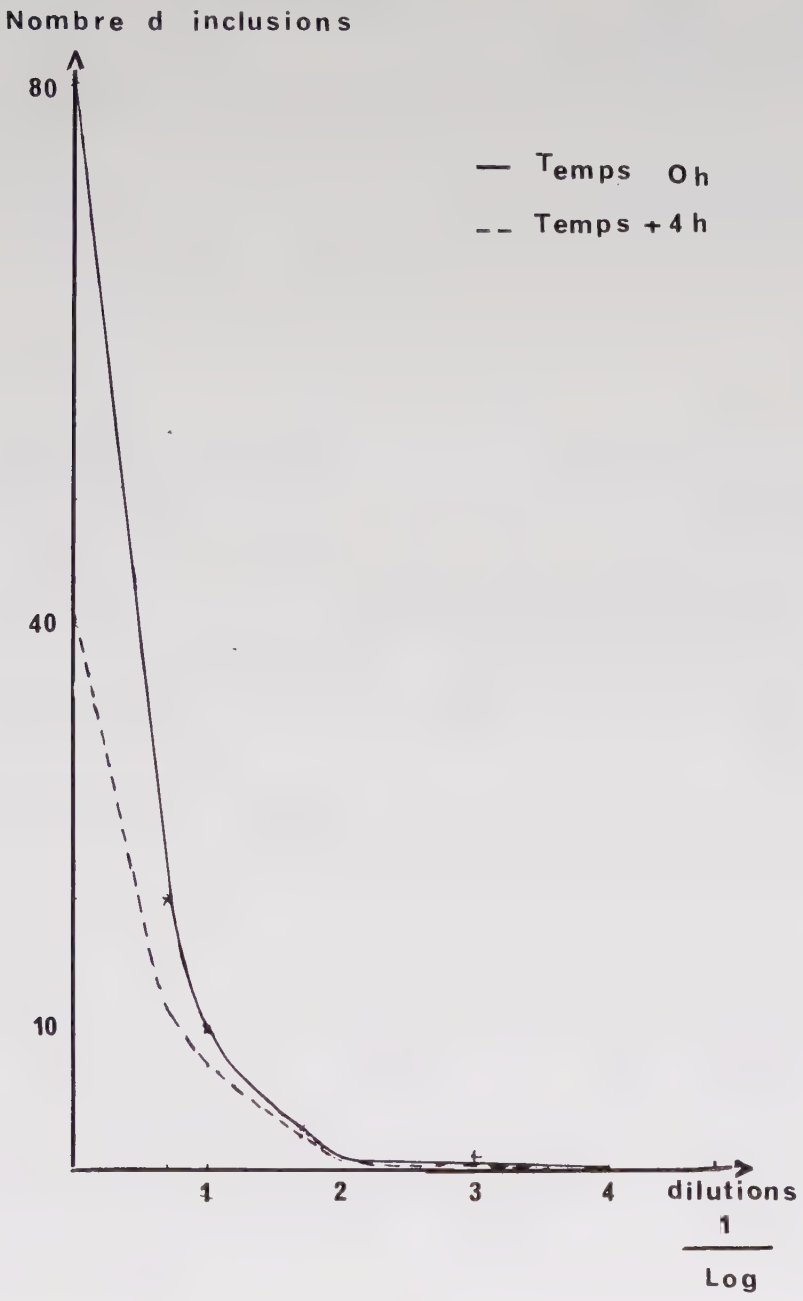
TABLEAU 8

Comptage des inclusions pour 500 cellules HeLa - 5 lames par dilution

Deux titrages à 4 heures d'intervalle avec le même inoculum. Titrage sur œufs en même temps que la seconde inoculation : LD 50 = $10^{-6,8}$.

DILUTIONS	NOMBRE D'INCLUSIONS SUR CHAQUE LAME										MOYENNE Temps 0	MOYENNE Temps + 4 H
	Temps 0					Temps + 4 H						
1/1	112	67	76	75	75	14	43	73	42	33	81	41
1/5	11	25	22	28	14	13	11	16	11	8	20	11,8
1/10	15	9	5	11	12	8	7	12	5	5	10,4	7,4
1/50	3	5	2	2	3	2	2	1	3	4	3	2,4
1/100	1	0	0	2	0	1	1	0	1	1	0,6	0,8
1/1000	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,8	0
1/10000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Courbes de titration d'un même inoculum à deux temps différents



Après conservation à — 20 °C, la perte de virulence est plus grande :

Temps 0	Temps + 2 semaines à — 20 °C
LD 50	
$10^{-7,5}$	$10^{-5,5}$

— *Influence des passages successifs sur œufs*

L'augmentation du titre est rapide, après trois passages successifs d'œuf à œuf.

	Nombre de passages a 7 jours d'intervalle		
	1er passage	2e passage	3e passage
LD 50	$10^{-5,5}$	$10^{-6,4}$	$10^{-7,5}$

Nous avons donc adopté le passage sur œuf de la souche avant toute expérimentation.

2.2.3. **Purification de l'agent infectieux**

Jenkin (44) a écrit qu'il était difficile d'appliquer le concept de pureté et d'homogénéité aux agents du groupe P.L.T. dont la population est composite. La purification eut deux objectifs :

1. Séparer l'ensemble de la population infectieuse des contaminants cellulaires issus de l'hôte, sac vitellin en général ou cellules de souches continues.

2. Isoler les diverses particules.

Pour cela différents procédés furent utilisés :

Wagner et coll. (98) purifient en précipitant par les alcools méthylique et éthylique. La baisse de l'infectivité est grande et les éléments altérés. Moulder et Weiss (63) font agir sur l'agent de la pneumonie du chat un sérum anti-sac vitellin d'œuf normal. La perte de l'azote total est importante et l'infectivité est abaissée. Brown et coll. (20) utilisent les enzymes protéolytiques, des nucléases et des agents tensio-actifs de surface, tel le dodecyl sulfate. Le germe obtenu est purifié mais est inactivé. En 1956, Benedict et O'Brien (14) emploient le lauryl sulfate de sodium pour obtenir un antigène purifié. Bernkopf et coll. (19) en 1960 purifient les particules de trachome à l'aide du « Fréon » (Trichlorofluoroéthane).

Il faut attendre les techniques utilisées par Tamura et Higashi de centrifugation différentielle et de centrifugation en gradients de densité pour obtenir séparément les éléments microbiens (90).

Pour notre travail, il était important d'obtenir une suspension infectieuse dépourvue des éléments de la cellule-hôte. Pour cela nous avons employé deux techniques appliquées à un inoculum constitué par le broyat de sacs vitellins infectés :

— Passage sur une colonne de DEAE-cellulose en tampon phosphate pH = 7,2. A condition d'opérer à + 4 °C, stérilement, nous obtenons une suspension débarassée des impuretés lipidiques du jaune d'œuf, et qui conserve son pouvoir infectieux. Le passage de cette suspension sur œufs a donné un résultat positif.

Préparation de la DEAE-cellulose

La préparation de la DEAE-cellulose est longue. 400 cc de DEAE-cellulose sont versés dans un grand bécher rempli de deux litres d'eau distillée; la poudre tombe lentement. Le surnageant est aspiré et on renouvelle les deux litres d'eau jusqu'à ce que la cellulose décante rapidement (au moins 1/2 heure) et que le surnageant soit clair ; 4 à 5 lavages sont nécessaires. On élimine ainsi les particules trop fines. On réalise ensuite l'activation de la DEAE-cellulose. La cellulose est versée sur un filtre Buchner et mise en contact avec une solution de soude 0,4 N pendant 30 minutes. Le lavage à l'eau distillée est nécessaire jusqu'à l'obtention de la neutralité. On ajoute à la DEAE-cellulose, décantée de son surnageant, un tampon phosphate pH = 7,4 constitué par les deux solutions mères suivantes :

— PO_4HNA monosodique 0,1 M : 200 ml ;
— PO_4Na_2 disodique 0,1 M : 800 ml.

Ce mélange est à diluer au $1/10^e$ pour l'emploi. Il faut rincer plusieurs fois (4 litres environ de tampon).

Préparation de la colonne

Nous utilisons une petite colonne, de 2 cm de diamètre, convenant à l'extraction de 5 grammes de sacs vitellins infectés. On bouche la colonne par une bourre de laine de verre mélangée à quelques billes de verre. On verse la DEAE-cellulose avec une quantité suffisante de tampon pour éviter les bulles d'air et les agglomérats. La DEAE-cellulose étant suffisamment tassée, à l'aide du courant continu de tampon, on dépose à sa surface la suspension infectieuse (broyat préalable au Waring Blendor 2 minutes et centrifugation 1800 t/mn pendant 5 minutes), puis posons au-dessus un papier filtre. Nous commençons l'élution par une solution de NaCl 0,15 M préparée en tampon phosphate 0,01 M - pH = 7,2. Puis une solution de

NaCl 0,35 M en tampon phosphate 0,01 M. On élimine, en premier, l'hémoglobine contenue dans le sac vitellin. Puis vient un liquide blanc, c'est la suspension de l'agent. Le liquide est dilué afin d'effectuer en négatif staining à l'aide de l'acide phosphotungstique (PTA) l'observation et le contrôle de la purification au microscope électronique.

Action du trichlorofloroéthane (*Fréon* (1) *ou Arcton* 113).

Ce produit très volatil, non inflammable, non miscible à l'eau, est miscible avec la plupart des liquides organiques, en particulier les graisses et lipides. Sa toxicité est très faible ; il est donc utilisé pour éliminer les constituants du sac vitellin de l'œuf.

Nous pesons 20 g de sacs infectés et homogénéisons pendant 2 minutes au Waring Blendor avec une solution *A* contenant :

— NaCl 9 ‰ : 100 ml ;

— Arcton 113 : 33,3 ml.

Après une légère centrifugation à 1800 t/mn pendant 5 minutes, on obtient un surnageant S 1, qui est conservé à + 4 ° avec 100 cc d'eau physiologique. Cette suspension homogénéisée 2 minutes au Waring Blendor centrifugée 1500 t/mn pendant 5 minutes redonne un surnageant S 2 qui est ajouté à S 1. Le culot est alors éliminé.

Le mélange S 1 + S 2 est dilué dans un même volume de la solution *A* homogénéisé au 1/3 et centrifugé. On continue à faire agir l'Arcton jusqu'à obtention d'un mélange de couleur laiteuse. A ce moment, la dernière centrifugation à 1500 t/mn pendant 5 minutes s'effectue sans addition d'Arcton. On obtient le surnageant définitif.

Il est centrifugé alors à 10 000 t/mn pendant une demi-heure à + 4°. Le culot est repris en tampon phosphate 0,01 M.

Cette technique fournit une suspension riche en particules infectieuses de l'agent de l'ornithose, mais qui a perdu toute infectiosité. Nous pouvons, comme le signale Bernkopf (19), obtenir une conservation de l'infectiosité si toutes les manipulations sont effectuées à froid (+ 4 °C).

Le contrôle du degré de pureté a été réalisé à l'aide de la microscopie électronique par la coloration négative : les suspensions sont diluées à l'aide d'une solution d'acide phosphotungstique à 2 % dans un tampon acétate.

---

(1) Fréon ou Arcton 113 : Usines Imperial Chemical Industries (France) S.A.

DISCUSSION

Les techniques de purification sur colonne de DEAE-cellulose et à l'aide de l'Arcton 113 sont longues et d'un très faible rendement. Les suspensions obtenues n'ont été utilisées qu'à titre comparatif pour une étude morphologique des particules en négatif staining et en coupes ultrafines (Pl. 1).

2.3. TECHNIQUES D'ÉTUDE ULTRASTRUCTURALE

Deux types de fixation ont été pratiqués :

2.3.1. La fixation à la glutaraldéhyde

2.3.1. *La double fixation à la glutaraldéhyde* à 1,80 % en tampon monodiphosphate selon Millonig à pH = 7,4, pendant une heure : rinçages en tampon Millonig pendant 12 heures, puis post-fixation en acide osmique à 1 %. Ces opérations s'effectuent à + 4 °C.

2.3.2. La fixation selon Ryter et Kellenberger

Préfixation de 15 mn en acide osmique à 0,1 % dans le milieu de culture, puis fixation 12 heures à la température de la pièce dans le fixateur de Kellenberger pH = 6,1 (acide osmique à 1 % dans un tampon acétate véronal additioné de chlorure de calcium 0,01 M). Après un rinçage en tampon acétate véronal, une post-fixation avec une solution d'acétate d'uranyl à 0,5 % en tampon véronal est effectuée pendant une heure.

— *Déshydratation à l'alcool Merck :*

— 70° deux fois 5 mn (+ 4°) ;
— 90° deux fois 5 mn (+ 4°) ;
— Absolu trois fois 20 mn (température ambiante) ;
— Propylène oxyde, deux fois 7 mn 1/2 (température ambiante).

2.3.3. Inclusions et coupes

a) *Epon :*

Une heure du mélange d'Epon complet à 50 % dans le propylène oxyde (2 parties du Mélange *A*, 1 partie du Mélange *B*).

Mise en capsule dans l'Epon complet dégazé sous vide,

Polymérisation pendant 72 heures à 60°.

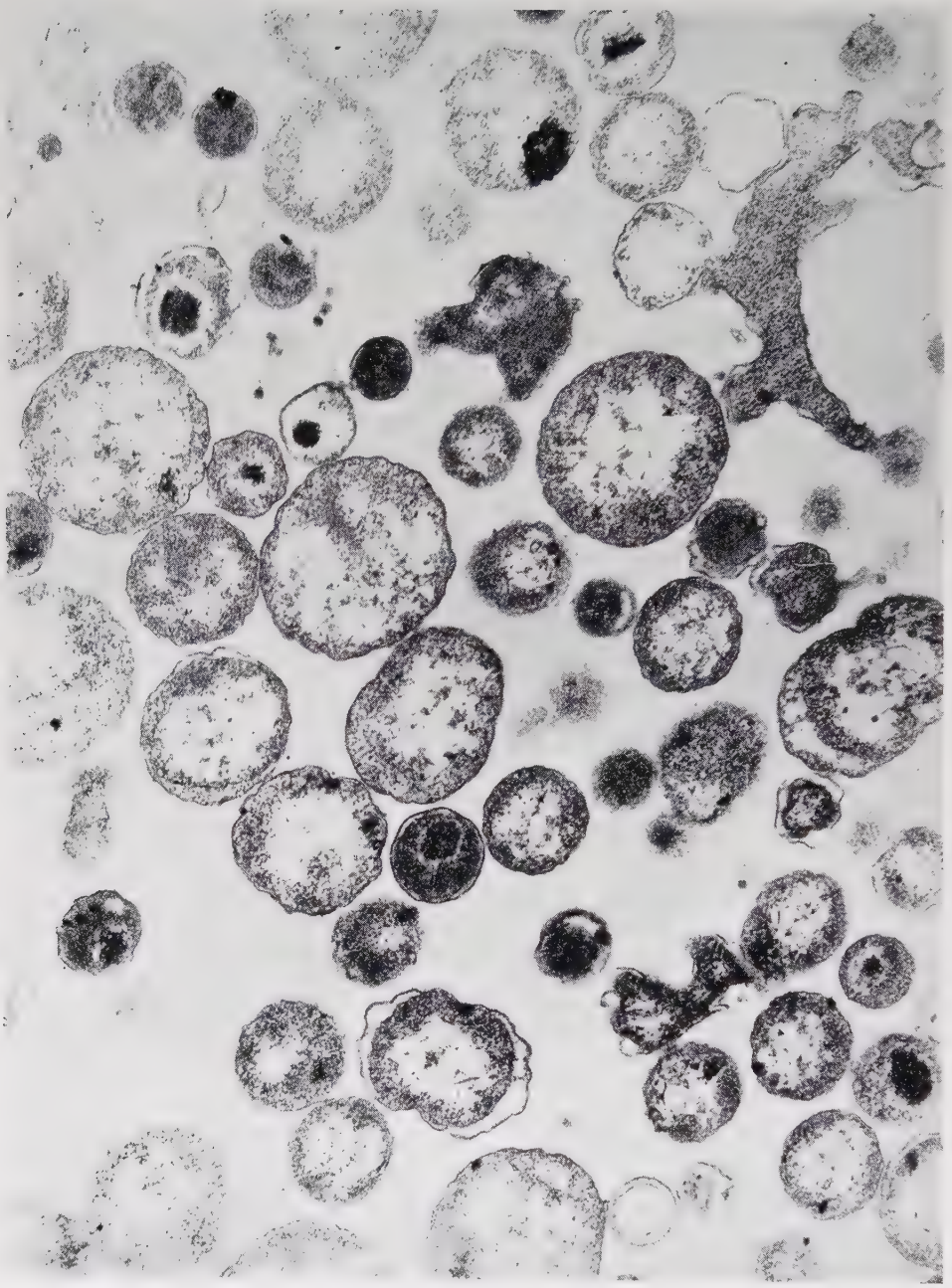


PLANCHE 1

Particules de l'agent de l'ornithose après purification par l'Arcton (G × 30.000).

b) *Glycol-méthacrylate* (GMA) :

Préparé selon Leduc et Bernhard (46) pour l'application de la technique de Rambourg de mise en évidence des glycoprotéides (75) et pour les études de digestion enzymatique.

Le processus recommandé par Leduc et Bernhard (46) est le suivant :

— Fixation 15 minutes dans la glutaraldéhyde tamponnée en Sörensen à pH = 7,2. Rinçage une nuit dans le tampon Sörensen. Puis passages dans les solutions suivantes :
  + GMA 70 % 15 minutes ;
  + GMA 80 % 15 minutes ;
  + GMA 70 % 15 minutes.

— Prépolymérisation 24 heures dans le mélange luperco-méthacrylate butyl.

— Polymérisation plusieurs jours sous rayons ultraviolets à + 4 °C.

— *Coupes :*

Coupes effectuées au diamant à l'ultratome 1 LKB et recueillies sur grilles électrolytiques « Mesh 300 » de 32 mm de diamètre sans film support, ou utilisées en coupes flottantes pour effectuer les réactions cytochimiques et cytoenzymatiques.

2.3.4. **Colorations**

a) *Colorations générales*

— 30 minutes d'acétate d'uranyl alcoolique à 2,5 % (une partie d'une solution aqueuse à 5 %, un partie d'alcool absolu).

— 10 minutes de citrate de plomb, selon Reynolds, suivies de deux rinçages dans une solution de soude 0,02 M et dans l'eau bidistillée.

— Film de carbone.

b) *Colorations spécifiques*

— *Mise en évidence des polysaccharides* (95)

— 10 minutes d'acide périodique à 1 % dans l'eau distillée suivies de plusieurs rinçages à l'eau distillée.

— 20 minutes de thiosemicarbazine à 1 % dans l'acide acétique à 10 %.

— Lavages avec des solutions d'acide acétique de concentrations décroissantes 10 %, 5 %, 2 %, puis en eau distillée.

— Protéinate d'argent à 1 % dans l'eau distillée pendant 40 mn pour la mise en évidence des polysaccharides simples et 24 heures pour celle des mucopolysaccharides.

— Montage sur grille sans autre coloration.

— Solution d'amylase à 0,5 % dans un tampon Sörensen à pH = 7,2 additionné de NaCl à 0,1 M pour les épreuves de digestion enzymatique du glycogène.

— *Montage sur grilles :* Film de carbone sans autre coloration.

— *Mise en évidence des glycoprotéines* (75) :

— Coupes flottantes pendant 15 minutes, 30 minutes et 1 heure sur une solution à 1 % d'acide phosphotungstique dans l'acide chlorhydrique à 10 %.

— Rinçages rapides à l'eau distillée.

— Montage sur grille, sans autre coloration.

— *Test enzymatique pour la digestion des acides nucléiques*

Les solutions suivantes ont été utilisées :

— *DNAse :*
Solution à 0,1 % dans l'eau distillée ajustée à pH = 6,2 — 6,6, à l'aide d'une solution de soude.

— *RNAse :*
Solution à 0,1 % dans l'eau distillée ajustée à pH = 6,2 — 6,8 à l'aide d'une solution de soude.

— *Pepsine :*
Solution à 0,5 % dans HCl N/10 ajustée à pH = 1,4.

— *Coloration régressive selon BERNHARD* (15)

Les inclusions sont faites en GMA après fixation glutaraldéhydique.

Les coupes sont colorées :

— 1 minute dans l'acétate d'uranyl à 0,5 %,

— 1 minute dans l'E.D.T.A. 0,02 M,

— 1 minute dans le citrate de plomb.

2.3.5. **Microscopie et photographie**

Elmiskop I Siemens, 80 Kvolts, double condensateur, diaphragme condenseur 400, diaphragme objectif 50 ou 30 μ. Pièce m polaire 40 000.

Plaques Gevaert Scientia 23 D 50, développées en Promicrol au 1/3 dans l'eau désionisée, pendant 12 minutes 1/2 à 20° C.

2.4. SYSTÈMES POUR L'OBSERVATION CONTINUE DES CULTURES A L'ÉTAT VIVANT

2.4.1. **Système de montage**

a) La chambre de Sykes-Moore (87) (Pl. 2-3)

Il s'agit d'une petite chambre ronde à faces parallèles, très manipulable. Elle comprend deux armatures métalliques assurant la contention des lamelles de verre, dont une porte la culture ; la lamelle de verre inférieure est séparée de la deuxième lamelle par un tore de silicone. Le système, de faible volume, est utilisable pour une observation de courte durée de cellules préalablement cultivées dans des boîtes de Pétri sous enceinte air-CO_2. Toutefois, il est possible de changer le milieu à l'aide d'une seringue, deux aiguilles traversant le tore de silicone : mais la manipulation est délicate (apport de bulles d'air gênant l'observation).

b) La chambre de Rose (81) (Pl. 4-5)

Il s'agit d'un système à faces parallèles sous membrane de dialyse dont le volume (2 ml) est plus grand que celui de la chambre de Sykes-Moore : ceci permet d'obtenir des cultures prolongées. De plus, l'emploi d'une membrane de cellophane placée au-dessus de la culture facilite l'étalement et l'adhérence des cellules sur la lamelle de verre. Avec ce système, nous effectuons la mise en culture des cellules, directement dans la chambre.

— *Montage de la chambre de Rose*

Les cultures cellulaires (1 goutte concentrée comportant environ 2×10^4 cellules) ou l'explant d'embryon de poulet sont déposés sur la lamelle inférieure de la chambre puis recouverts, d'un geste rapide, par la bande de cellophane

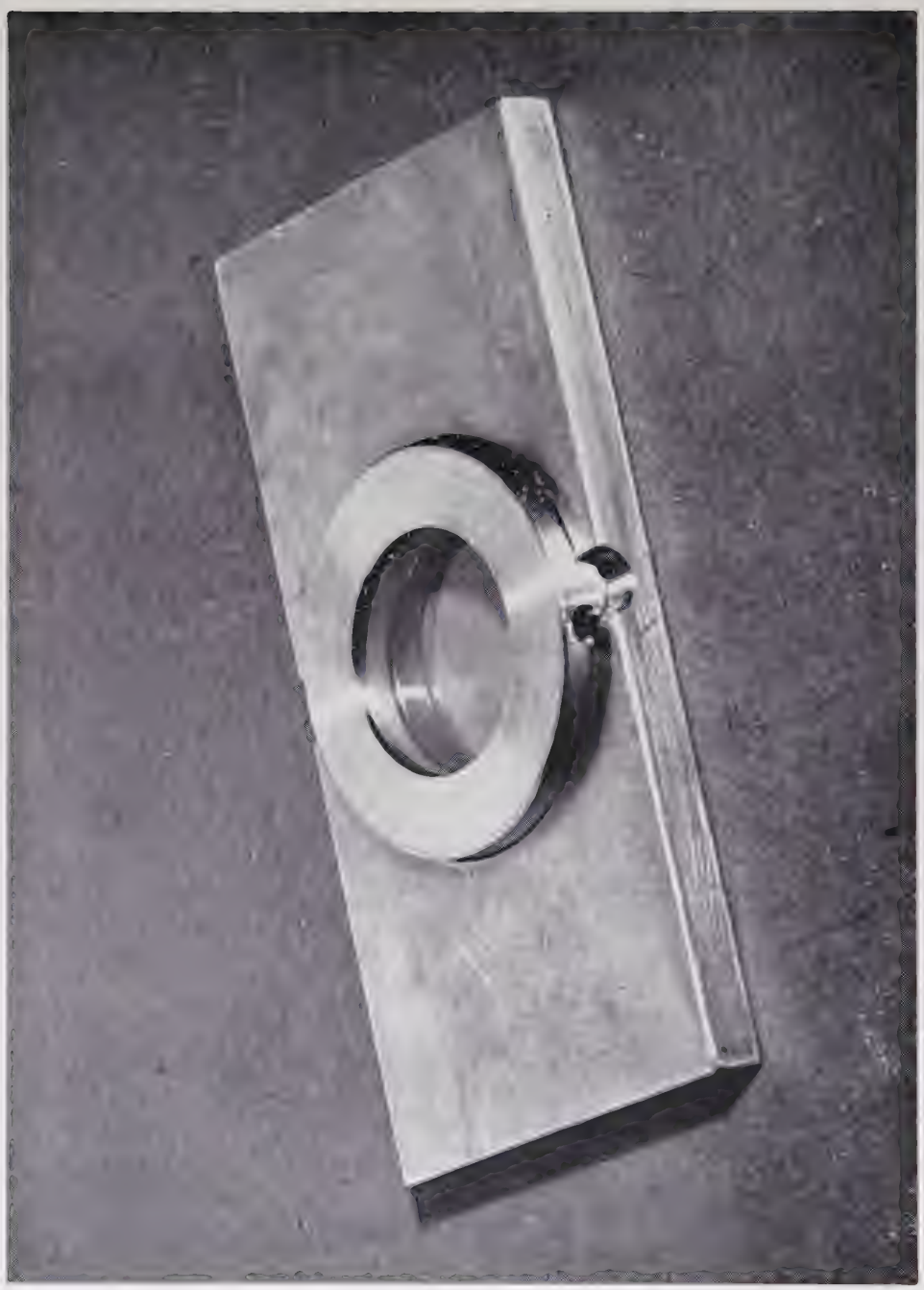


PLANCHE 2
La Chambre de Sykes-Moore.

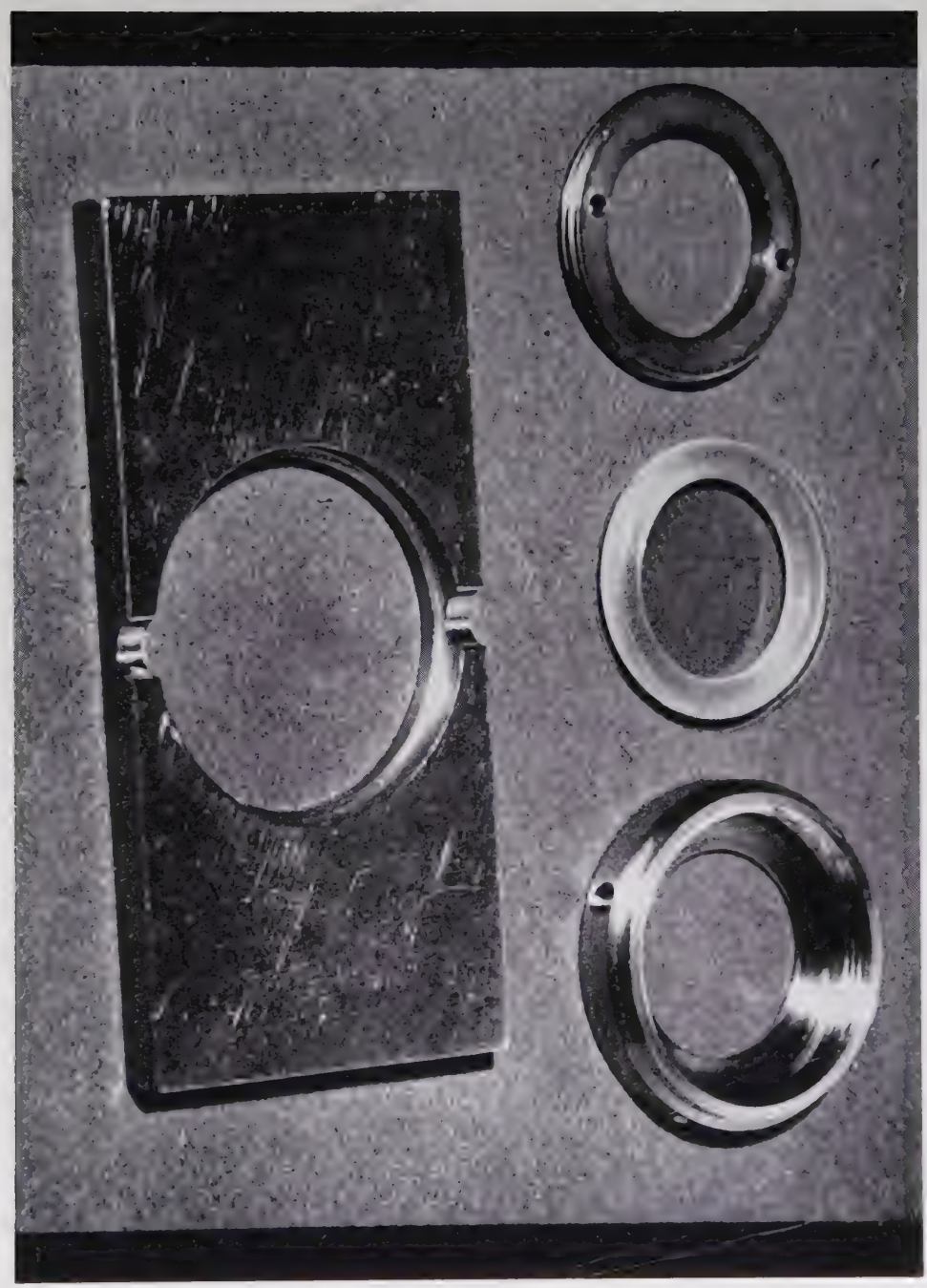


PLANCHE 3
Les différents éléments de la Chambre de Sykes-Moore.
Les deux lamelles de verre reposent entre le tore de silicone.

PLANCHE 4
La Chambre de Rose montee.

PLANCHE 5

Les différents éléments de la Chambre de Rose. La membrane de dialyse repose sur le joint de caoutchouc « pluribar ».

Visking de 4 cm de largeur, préalablement lavée à froid, stérilisée à l'alcool et rincée abondamment dans une solution de Hanks stérile. Le joint de caoutchouc silicone constituant les parois latérales de la chambre est mis en place, puis la seconde lamelle formant toit, l'ensemble est solidarisé entre les deux armatures métalliques de la chambre par quatre boulons.

Nous avons remplacé le joint de caoutchouc silicone par un joint de Pluribar (1) plus hermétique et d'emploi plus aisé. Pour le remplissage, on pique deux aiguilles au travers du joint et on injecte par l'une d'elles, l'autre formant sortie d'air, 2 ml de milieu de culture au-dessus de la membrane de dialyse. Parallèlement à l'étude à l'état vivant, nous pouvons aisément démonter la chambre et effectuer les contrôles de fixation et coloration correspondants : nous récupérons la lamelle et la cellophane portant les explants ou les zones de migration cellulaire et effectuons les colorations de May-Grünwald-Giemsa.

Nous pouvons, après plusieurs changements de milieu, conserver les cultures pendant plusieurs jours.

(1) Pluribar : Etablissements Barville.

— *Essai de perfusion*

Afin d'observer en durée continue les chambres de Rose, nous avons essayé d'adapter au système microscope-étuve une seringue à perfusion dont le débit était de 1 cm^3 par 24 heures.

Cette mise au point, difficile, présente l'inconvénient de mouvements de turbidité dans la chambre ainsi que la formation de bulles d'air.

2.4.2. **Technique microcinématographique**

Les enregistrements microcinématographiques ont été réalisés sur statifs Wild N 10, équipés de condensateurs « longue focale », d'objectifs de phase à immersion Fluotar × 50 ou × 100 et d'un oculaire 6 ×. Microscope et préparations sont enfermés dans une enceinte thermostatée à 37 °C (Pl. 6) ; l'éclairage est constitué d'un brûleur au Xénon XBO 150 W, stabilisé et refroidi par air. La lumière est filtrée pour le proche ultra-violet et l'infra-rouge ; on utilise, en outre, un filtre Wratten 60 dont la bande passante maximale se situe à 525 mμ. La lumière est interrompue entre chaque prise d'image, et l'exposition de chaque image est de 0,5 seconde. Deux types de caméras ont été employés : Paillard 16 mm et Arriflex 16 mm, équipées chacune de leur propre dispositif image par image et de leur intervallomètre. Des objectifs de 50 ou 75 mm sont montés sur les caméras : Kern pour Paillard et Schneider pour Arriflex, qui permettent à volonté de modifier le champ microscopique tel qu'il est recueilli à la sortie de l'oculaire. Une lunette de visée Wild, placée entre caméra et microscope assure la visée

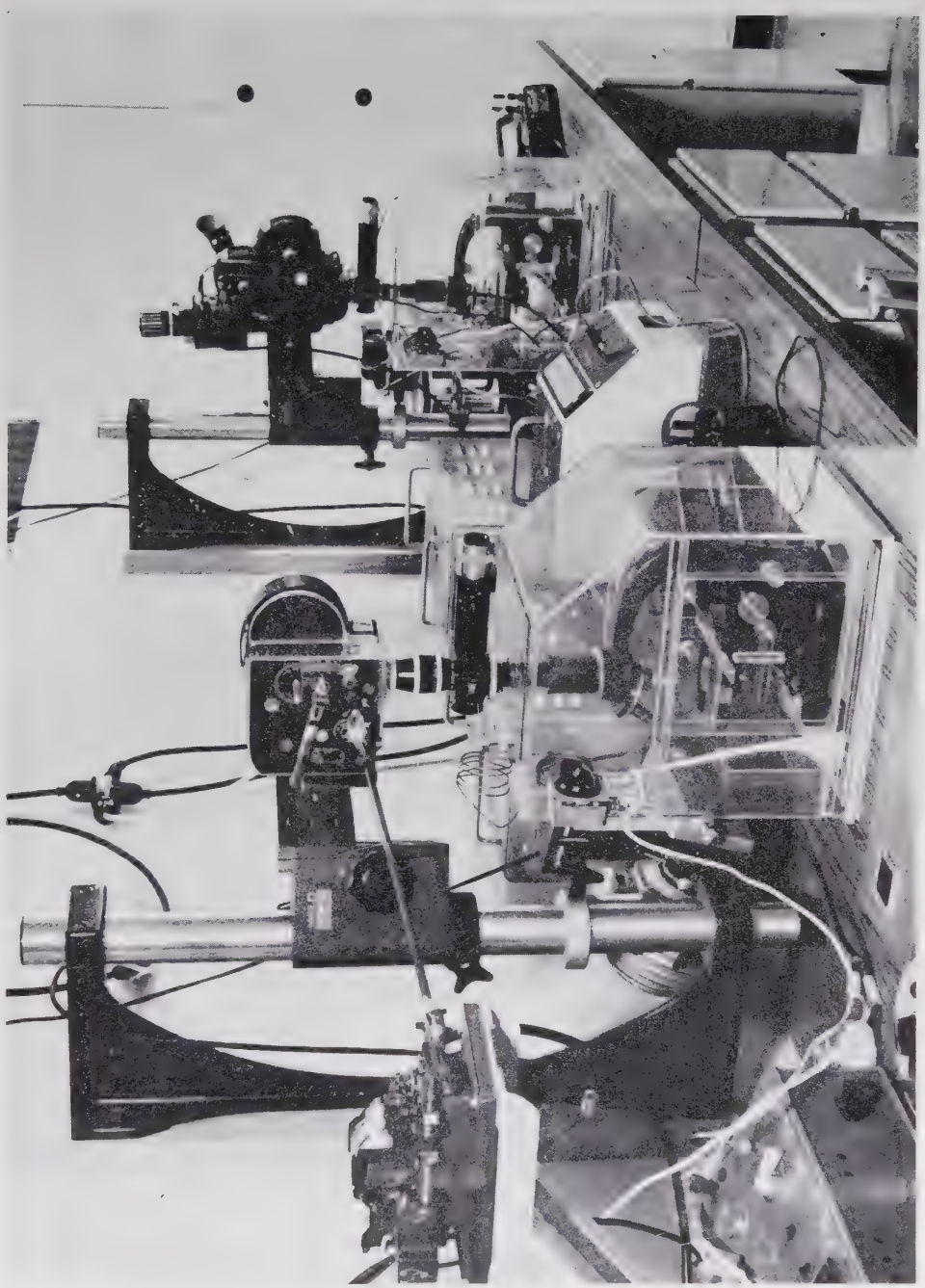


PLANCHE 6
Installation de microcinématographie.

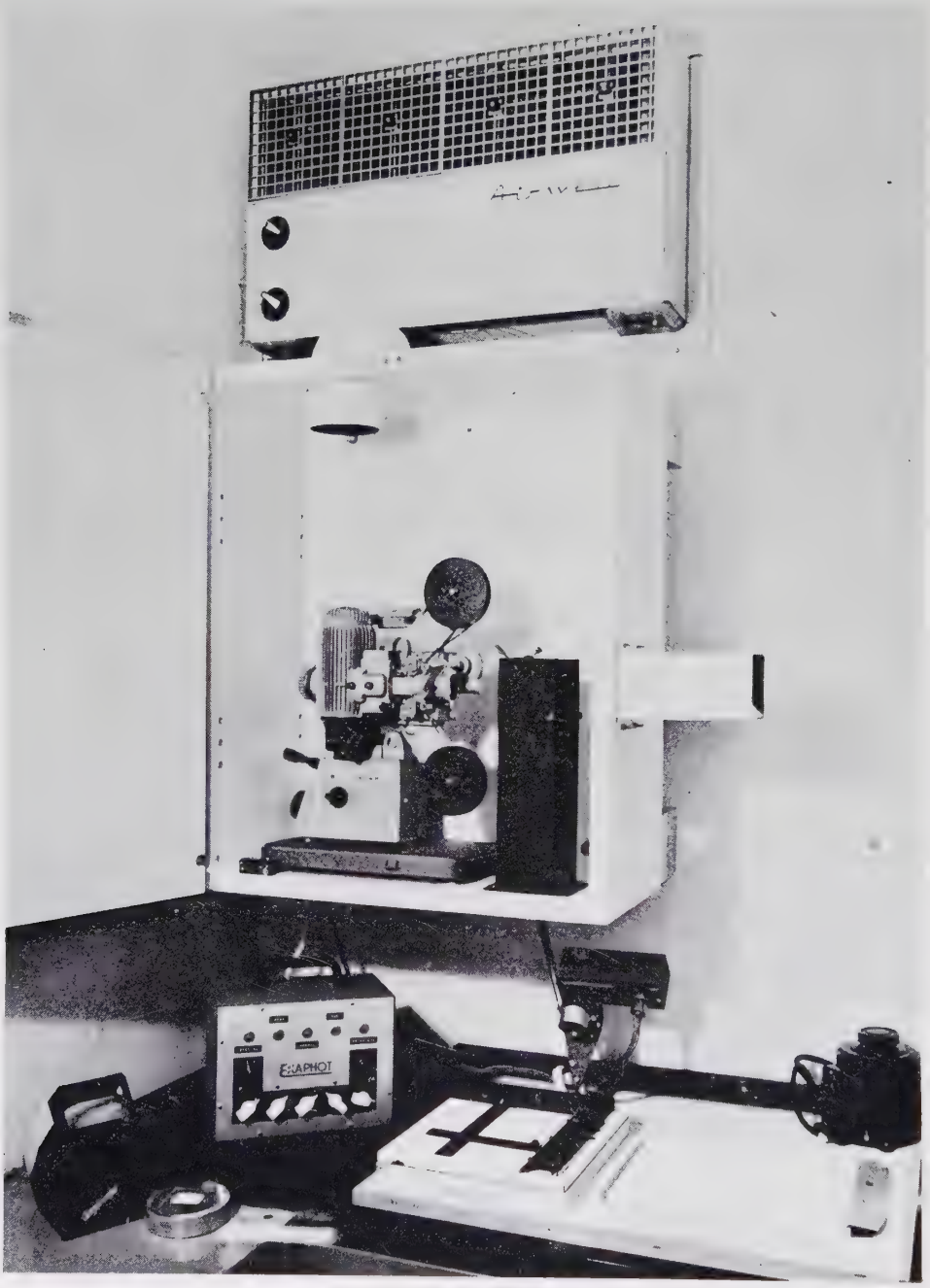


PLANCHE 7
Installation pour l'analyse des films.

réflexe continue sur l'image aérienne. Le temps de pose et la qualité de l'image sont contrôlés par un système simple, inédit, antérieurement décrit (60). L'émulsion utilisée est une négative panchromatique, la Scienta Gevaert 45 C 62 de sensibilité 12 ASA développée à 18° dans le Nogranol pendant 6 minutes afin d'obtenir un facteur de contraste d'environ α 2. Le dispositif de développement est du type Hansen de Oude Delft, semi-automatique, les films ont été analysés image par image sur l'analyseur mis au point au laboratoire (80) (Pl. 7). Cet appareil permet les relevés graphiques sur coordonnées rectangulaires et les mesures, ainsi que l'impression automatique des papiers photographiques. Il est pourvu d'un compteur d'images qui permet de connaître à tout moment, compte tenu des cadences d'enregistrements, le temps biologique du phénomène.

Ces cadences ont été variables, d'une image toutes les 5 secondes jusqu'à une image toutes les 30 secondes, donnant à la projection standard du film (24 images/seconde) une accélération de 120 à 720 fois. A titre d'exemple pour les enregistrements les plus lents, une minute de projection correspondra à 12 heures d'observation continue.

Pour la microcinématographie interférentielle, la caméra peut être couplée à un microscope interférentiel (Nachet 300), selon Nomarski (68) muni des combinaisons optiques 6 × 50 et 6 × 105. Ce microscope ne pouvant recevoir que des lames porte-objet de 0,8 à 1 mm, les cultures ont été montées sur lames et lutées à la paraffine.

2.5. JUSTIFICATION DU CHOIX DES DIFFÉRENTES TECHNIQUES UTILISÉES

Compte tenu des résultats des différentes mises au point techniques, nous avons utilisé :

— *Pour la suspension infectieuse :*

— Le passage régulier sur œuf de poule embryonné pour augmenter la virulence du germe ;

— L'entretien de la souche de l'agent de l'ornithose sur cellules en vue des observations en microscopie à contraste de phase ;

— Un titrage exprimé sur cellules par le pourcentage du nombre d'inclusions en raison de sa rapidité de lecture et de sa reproductibilité.

— *Pour le choix des cellules*

La cellule fibroblastique a présenté les meilleures qualités optiques pour une observation prolongée à l'état vivant.

Le cytoplasme est clair avec des organites cellulaires : mitochondries, golgi, très discernables. Par contre, les mitoses sont très nombreuses et se succèdent rapidement, ce qui nécessite au départ de la culture un ensemencement cellulaire peu dense.

Les deux systèmes de culture Sykes-Moore et chambre de Rose permettent d'obtenir d'excellentes images en microcinématographie. Mais nous avons préféré la chambre de Rose pour différents avantages : son volume est grand, elle permet la culture prolongée des cellules, le champ de prise de vue est plus important.

— *Pour les études immunologiques*

La cellule macrophage était la plus intéressante. Il fallait, avant de poursuivre les études *in vivo*, connaître sa réceptivité, ce qui motiva son étude en ultrastructure.

III

RÉSULTATS

3.1. ÉTUDE MORPHOLOGIQUE ET CYTOCHIMIQUE DE L'AGENT INFECTIEUX

ÉTUDE MORPHOLOGIQUE

L'étude morphologique et ultrastructurale du cycle de développement de l'agent de l'ornithose a été effectuée, comme nous l'avons dit plus haut, sur différents types cellulaires. Nos résultats ont fait l'objet de publications (en annexes n° 1, 3, 4) dont nous résumerons et discuterons ici les traits essentiels concernant le cycle évolutif de l'agent de l'ornithose et la structure de ses éléments.

3.1.1. Cycle de développement intracellulaire

A la sixième heure après l'inoculation aucune différence significative n'apparaît entre les cellules infectées et les cellules témoins. Nous ne mettons pas en évidence des particules infectées en utilisant le microscope optique. Les surfaces cellulaires présentent en microscopie électronique des membranes ondulantes, émettant de nombreux pseudopodes témoins d'une intense activité endocytaire (Pl. 8). Cependant, nous n'avons pas mis en évidence à la surface des cellules des particules libres ou en voie de pénétration. La majorité des cellules examinées ne semble pas parasitée. A l'intérieur de certaines d'entre elles, on rencontre des corps intermédiaires ou des corps initiaux isolés au sein du cytoplasme et entourés d'une membrane vacuolaire (Pl. 9).

Très rarement, ils sont groupés à l'intérieur d'une seule vacuole de petite taille, bordée d'une unit membrane souvent irrégulière. On peut penser que les membranes plasmiques entourant chaque corps phagocyté ont fusionné pour constituer une vacuole unique dont la membrane se moule sur le contour des particules qui sont au contact direct de cette membrane.

A la douzième heure, on note dans le cytoplasme de certaines cellules infectées la présence de formations arrondies groupées soit par deux, soit par quatre (tétrades), situées généralement dans une région proche de la concavité du noyau. Elles sont colorées en bleu par le Giemsa. C'est selon la terminologie de Bedson le stade des corps initiaux. Nous retrouvons en images ultrastructurales cette disposition des particules en couronne autour de l'appareil de golgi. Elle nous semble intéressante, car elle permet d'imaginer le cheminement des particules entrées simultanément en plusieurs points de la surface cellulaire, conformément au schéma de la migration des vacuoles de pinocytose.

A la vingt-quatrième heure, les corps initiaux deviennent plus nombreux et augmentent de taille. Ils affectent la forme de petites « morula » évoquant l'agrégation de plusieurs corps arrondis (Pl. 10). Ils sont toujours colorés en bleu par le May-Grünwald-Giemsa et la coloration à l'acridine orange montre à ce stade une formation rouge sensible à la ribonucléase. La microscopie

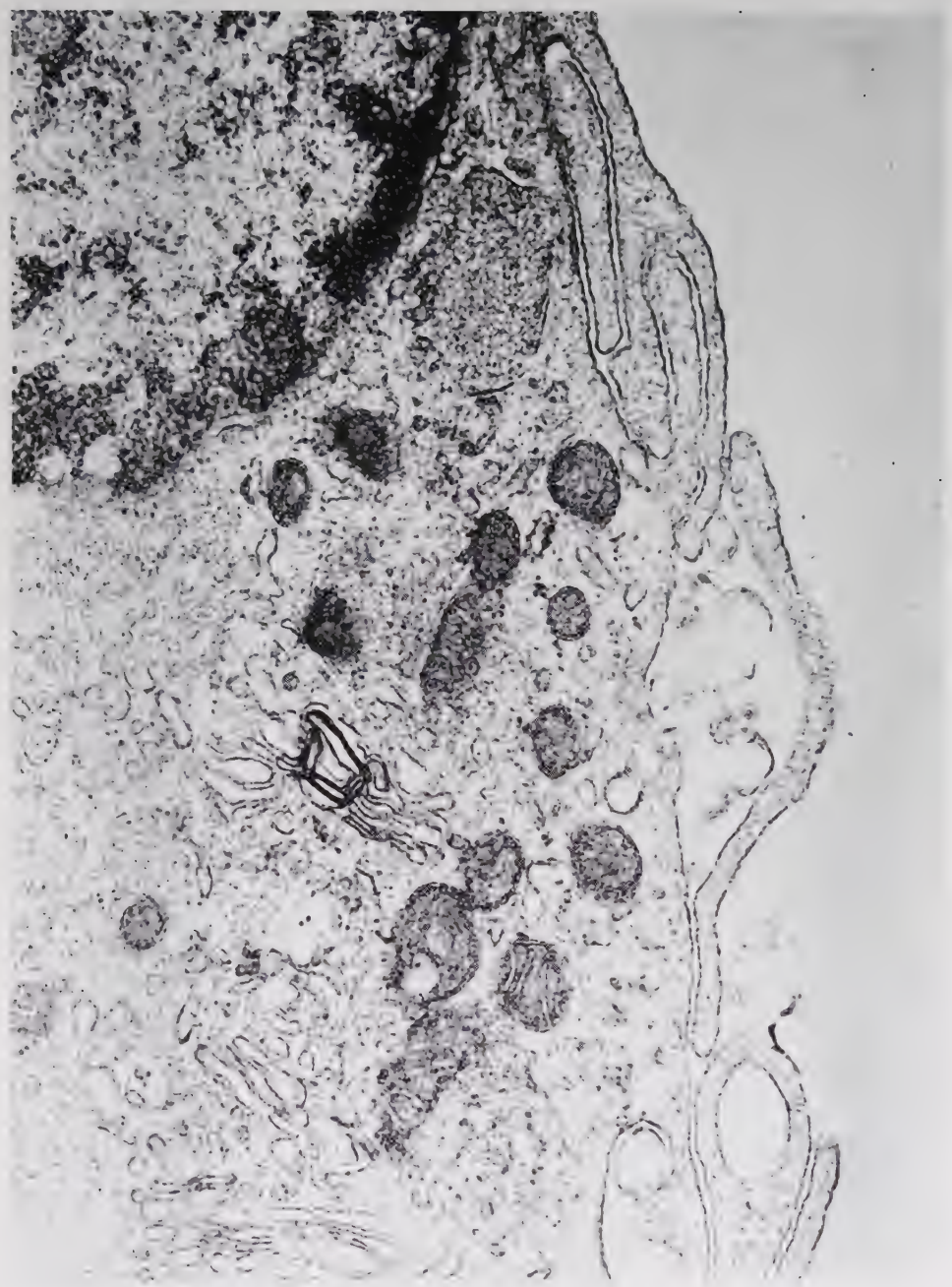


PLANCHE 8

Macrophage temoin après 78 heures de culture. Noter le développement du Golgi et du systeme lysosomal (G × 50.000).

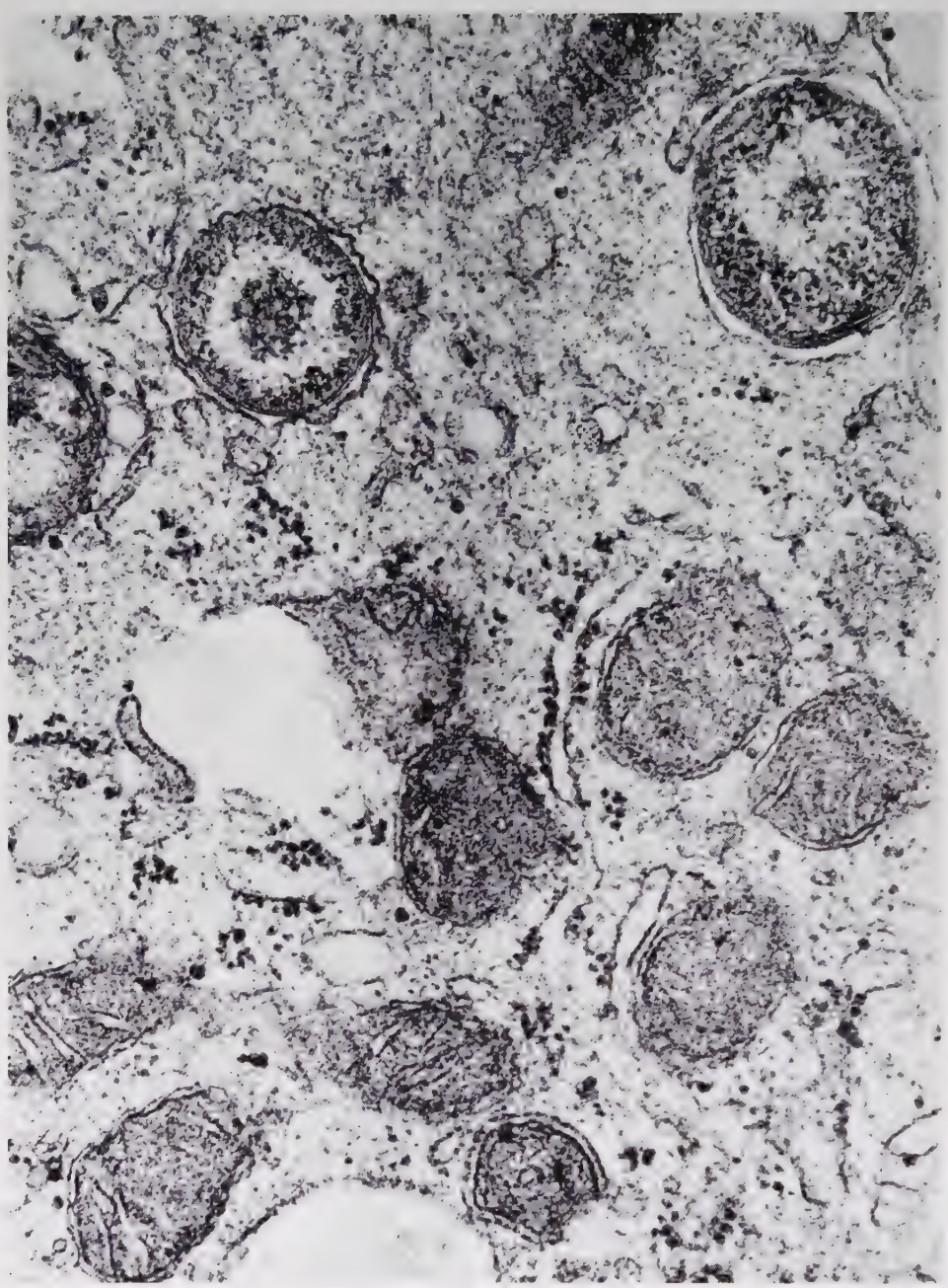


PLANCHE 9

Macrophage 6 heures après l'infection : corps intermédiaires inclus dans une vacuole.

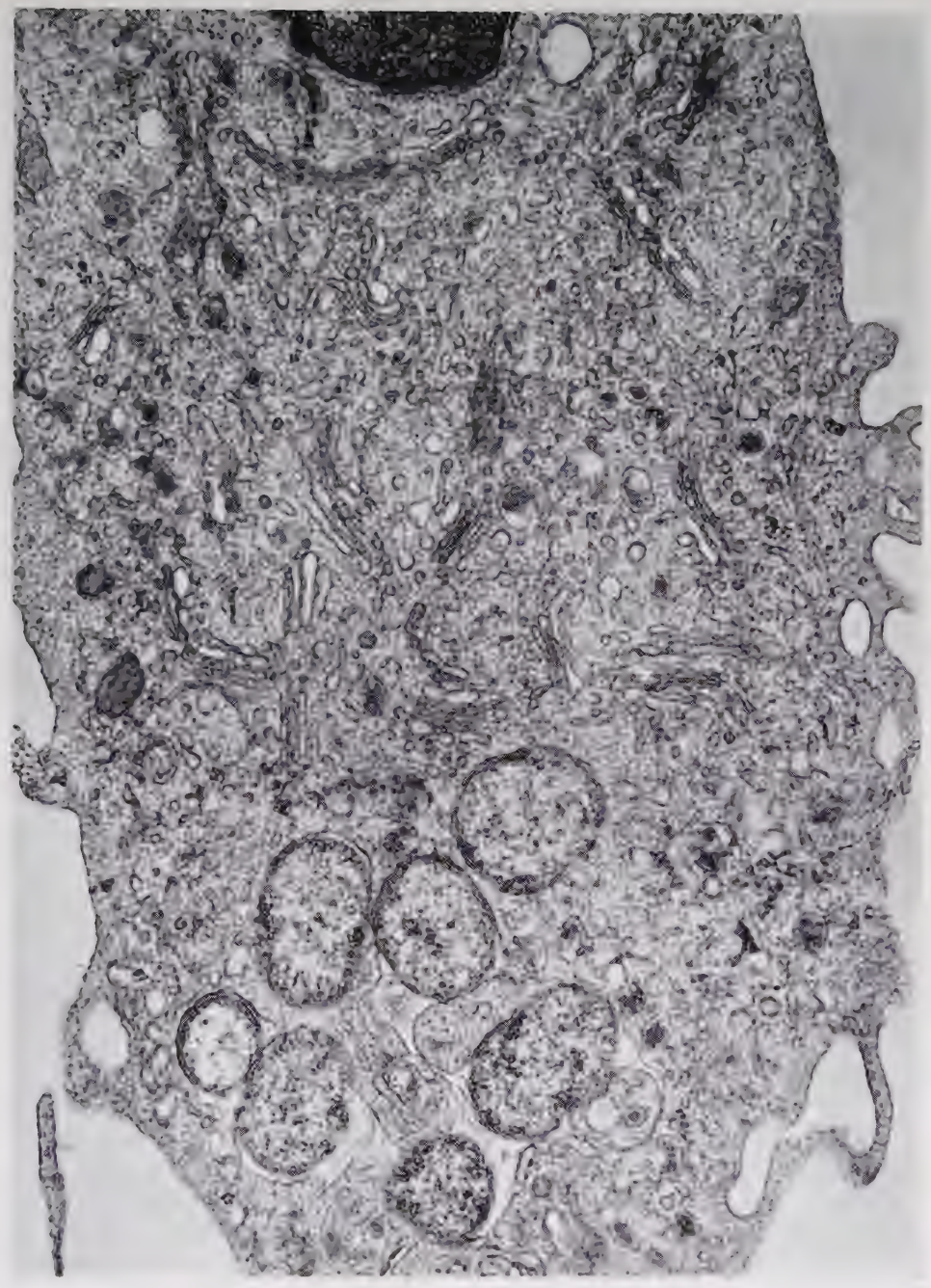


PLANCHE 10

Macrophage 24 heures après l'infection. Formation d'une inclusion constituée uniquement de corps initiaux (G × 18.000).

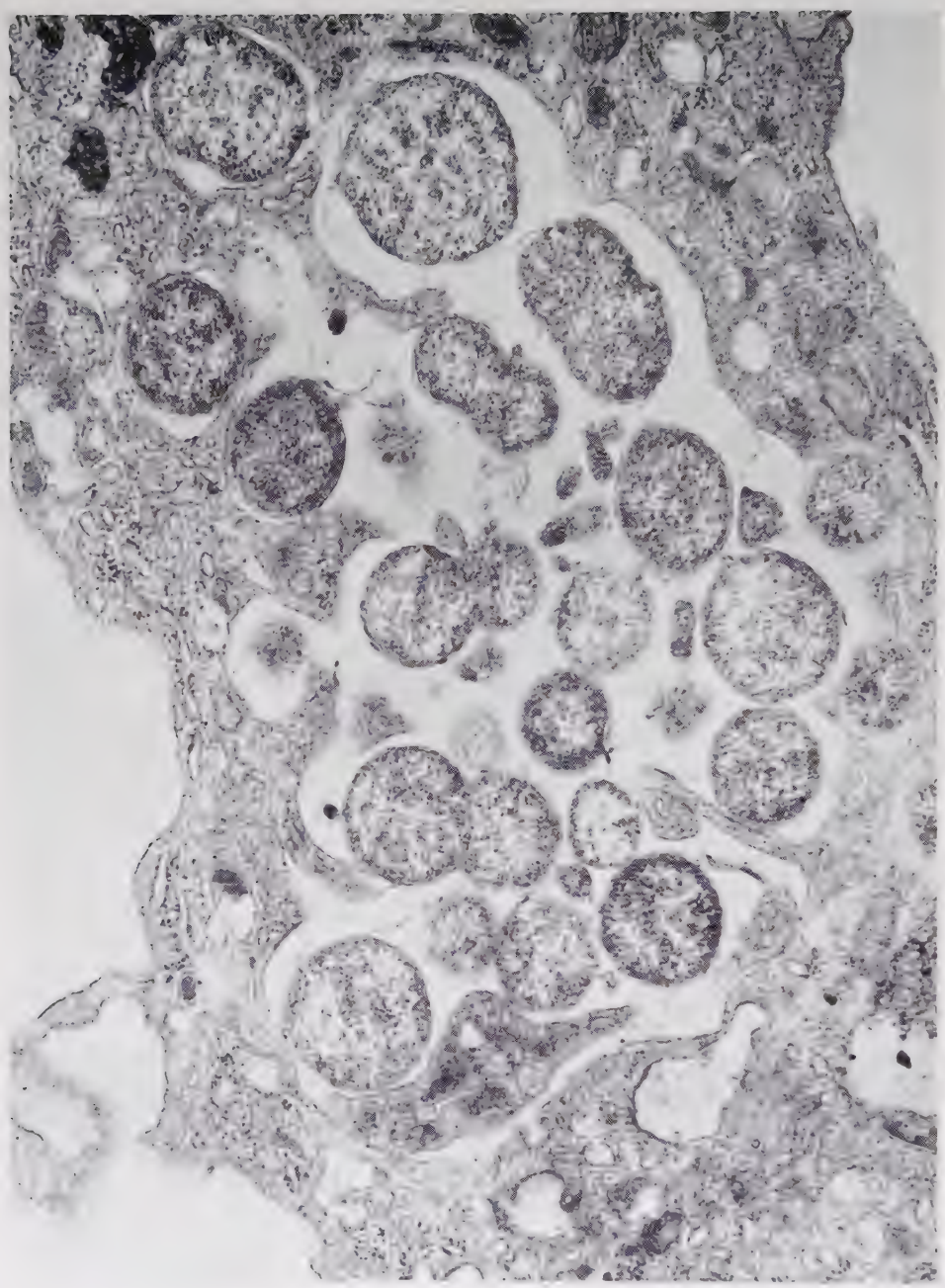


PLANCHE 11

Formation de la vacuole d'inclusion : 24e heure.
Anastomose des vacuoles de phagocytose de chaque corps initial (G × 30.000).

électronique montre des corpss initiaux en nombre variable, 5 à 7 sur une coupe. Les membranes des vacuoles primitives entourant chaque élément ont fusionné en constituant un système « alvéolaire » communiquant (Pl. 11), rappelant l'aspect très rarement observé à la sixième heure.

Lorsque le nombre des éléments est plus élevé, de l'ordre d'une quinzaine, l'ensemble des corps initiaux se trouve réuni dans une grande vacuole unique. La majorité des corps initiaux sont de taille identique 0,6 μ environ, et de forme sphérique. Cependant, des structures allongées apparaissent, présentant une constriction médiane suggérant l'existence d'une fission binaire. (Pl. 11).

A la trentième heure, une inclusion est formée. Les corps initiaux toujours présents sont mêlés à de nombreuses granulations plus petites colorées en violet par le Giemsa. Il s'agit des corps élémentaires.

De la quarante-huitième heure à la soixante-douzième heure environ, l'inclusion devient progressivement plus importante, entourant le plus souvent la région centro-cellulaire. Parfois, elle refoule le noyau, enserre et réduit l'appareil de golgi limitant le cytoplasme à une mince couronne périphérique (Pl. 12). Elle est alors constituée de particules très différentes, comme le montre les images en microscopie électronique.

C'est au stade de la soixante-douzième heure que l'étude de la structure de l'inclusion est la plus facile (Pl. 13). La microscopie électronique montre, après double fixation à la glutaraldéhyde et à l'acide osmique, trois types de particules et des formations vésiculaires dont nous essaierons de préciser l'origine.

3.1.2. **Les corps élémentaires** (Pl. 14 - fig. 4)

Il s'agit de particules de 300 à 350 $m\mu$ de diamètre.

Ils sont nettement délimités par une membrane externe du type « unit membrane » de 100 Å constituée par deux feuillets d'environ 35 Å denses aux électrons, séparés par un espace clair d'environ 30 Å. Dans la grande majorité des cas, la membrane externe limite un corps élémentaire presque parfaitement sphérique. On peut cependant trouver des images plus irrégulières. Cette membrane est parfois séparée du contenu du corps élémentaire par un espace clair irrégulier. Il existe également une membrane interne, mais elle est difficilement visible après double fixation, n'apparaissant qu'en certains points de son pourtour : nous reviendrons plus loin sur ce problème de fixation pour la microscopie électronique. On observe une masse homogène et compacte excentrée dans les corps élémentaires : le nucléoïde. Il est entouré par une zone homogène dense aux électrons dans laquelle se trouvent des grains de 150 Å s'apparentant par leur taille à des ribosomes. En outre, on y rencontre parfois une formation composite de plusieurs granulations hétérogènes jusqu'à 8 sur une seule section, chacune mesure 220 Å environ :

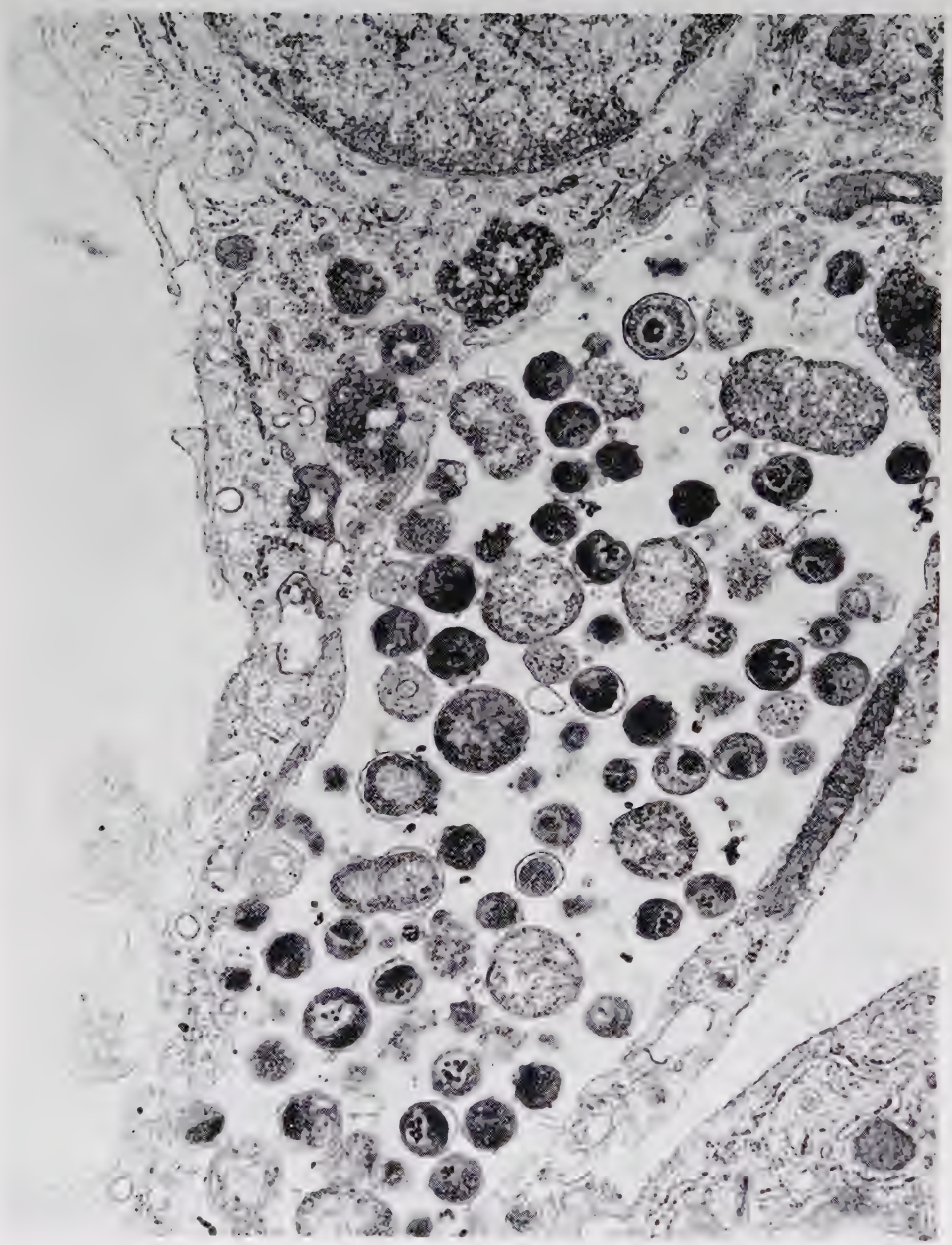


PLANCHE 12

Inclusion à 72 heures d'infection montrant une seule vacuole remplie d'agents infectieux à différents stades de développement (G × 10.000).

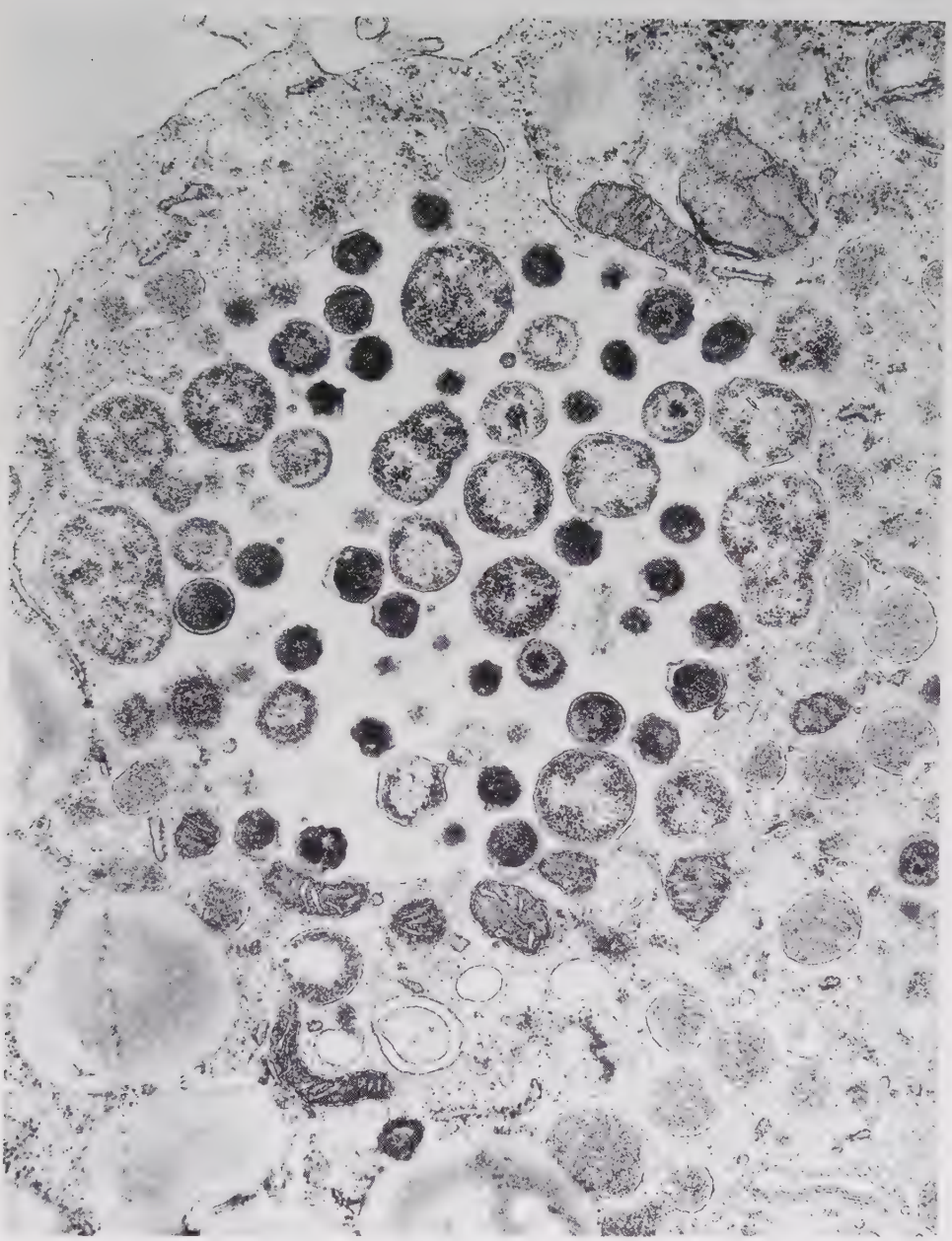


PLANCHE 13

Inclusion à 72 heures d'infection dans un macrophage (G × 10.000).

cette formation est elle-même constituée de sous-unités de 40 à 45 Å. Nous avons montré qu'il s'agit de glycogène. Les corps élémentaires abondants occupent généralement le centre de la vacuole.

3.1.3. **Les corps initiaux** (Pl. 14 - fig. 1)

Ils se distinguent complètement des corps élémentaires. Ce sont des structures plus grandes, arrondies, de 0,550 à 1 μ de diamètre environ. Ils sont cernés par deux « unit membrane », toujours clairement visibles après double fixation. Concentriques, légèrement sinueuses, ces deux membranes sont séparées l'une de l'autre par un espace clair plus ou moins large d'environ 100 Å. On ne remarque pas de condensation centrale, au contraire le corps initial possède une structure relativement lâche où sont bien visibles, au centre, des filaments de 20 Å, organisés en réseau irrégulier, et à la périphérie une zone plus dense aux électrons dans laquelle se distinguent des grains dont la taille est voisine de 150 Å et qui, compte tenu de nos propres observations en cytochimie ultrastructurale par digestion enzymatique et de celles d'autres auteurs qui les ont isolés, peuvent raisonnablement être considérés comme des grains de ribonucléoprotéines (R.N.P.). Certains corps initiaux plus allongés, dépassant 1 μ, présentent un étranglement médian. A la soixante-douzième heure de l'infection cellulaire, les corps initiaux sont peu nombreux et situés au pourtour de la vacuole.

3.1.4. **Les corps intermédiaires** (Pl. 14 - fig. 2-3)

Un troisième type de particules est présent à l'intérieur de la vacuole d'inclusion : le corps intermédiaire. Il est sphérique, lui aussi limité par deux jeux de membranes ; son diamètre de 450 $m\mu$ se situe entre ceux du corps initial et du corps élémentaire ; sa structure comprend un nucléoïde central qui semble se développer en relation avec des structures fibrillaires visibles à sa périphérie. Le diamètre de ces fibrilles est le même que celui des filaments décrits dans le corps initial. A la périphérie on retrouve, plus dense, la structure de celui-ci.

3.1.5. **Les formations vésiculaires** (Pl. 14)

On trouve, disséminés entre les différentes particules, des éléments de taille variable, 50 à 200 $m\mu$, sphériques ou ovoides, généralement clairs aux électrons, bordés d'une « unit membrane » (14). Ces éléments sont libres ou plus souvent accolés aux corps initiaux, plus rarement aux corps intermédiaires. Ils pourraient provenir de la membrane limitant la vacuole d'inclusion pour les plus volumineux d'entre eux, mais aussi pour les plus petits (15) venir de la membrane externe des corps initiaux. Leur signification est des plus intéressante à considérer puisqu'apparemment de même structure ils seraient issus de deux formations très différentes, le corps initial du parasite et la vacuole d'inclusion formée à partir de la membrane plasmique de la cellule.

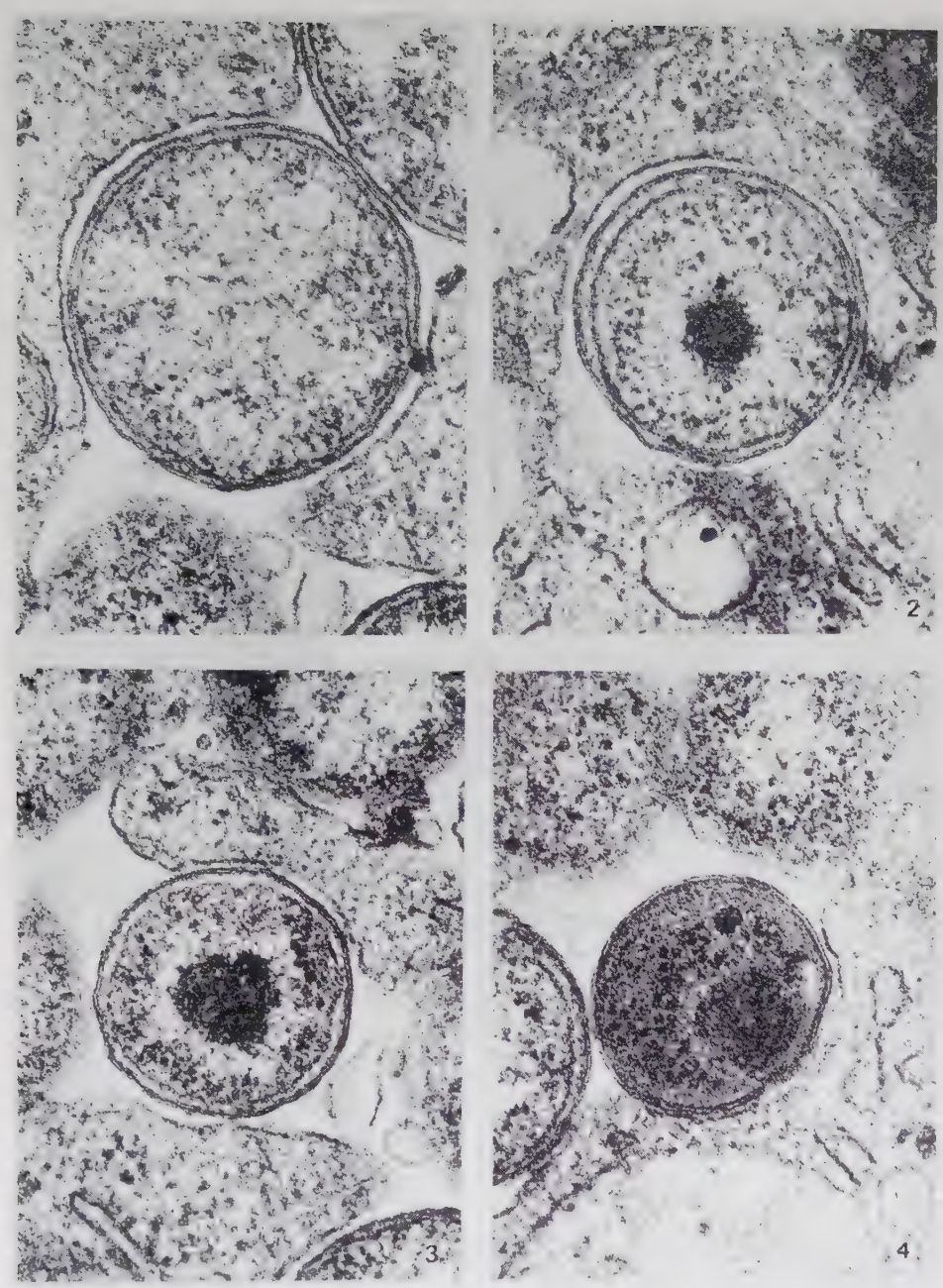


PLANCHE 14

Particules de l'agent de l'ornithose après fixation glutaraldéhyde - Acide osmique.

Fig. 1. — *Corps initial.*

Fig. 2-3. — *Corps intermédiaires à deux stades différents d'évolution.*

Fig. 4. — *Corps élémentaire. Noter que la membrane interne n'est pas visible.*

(G x 100.000)

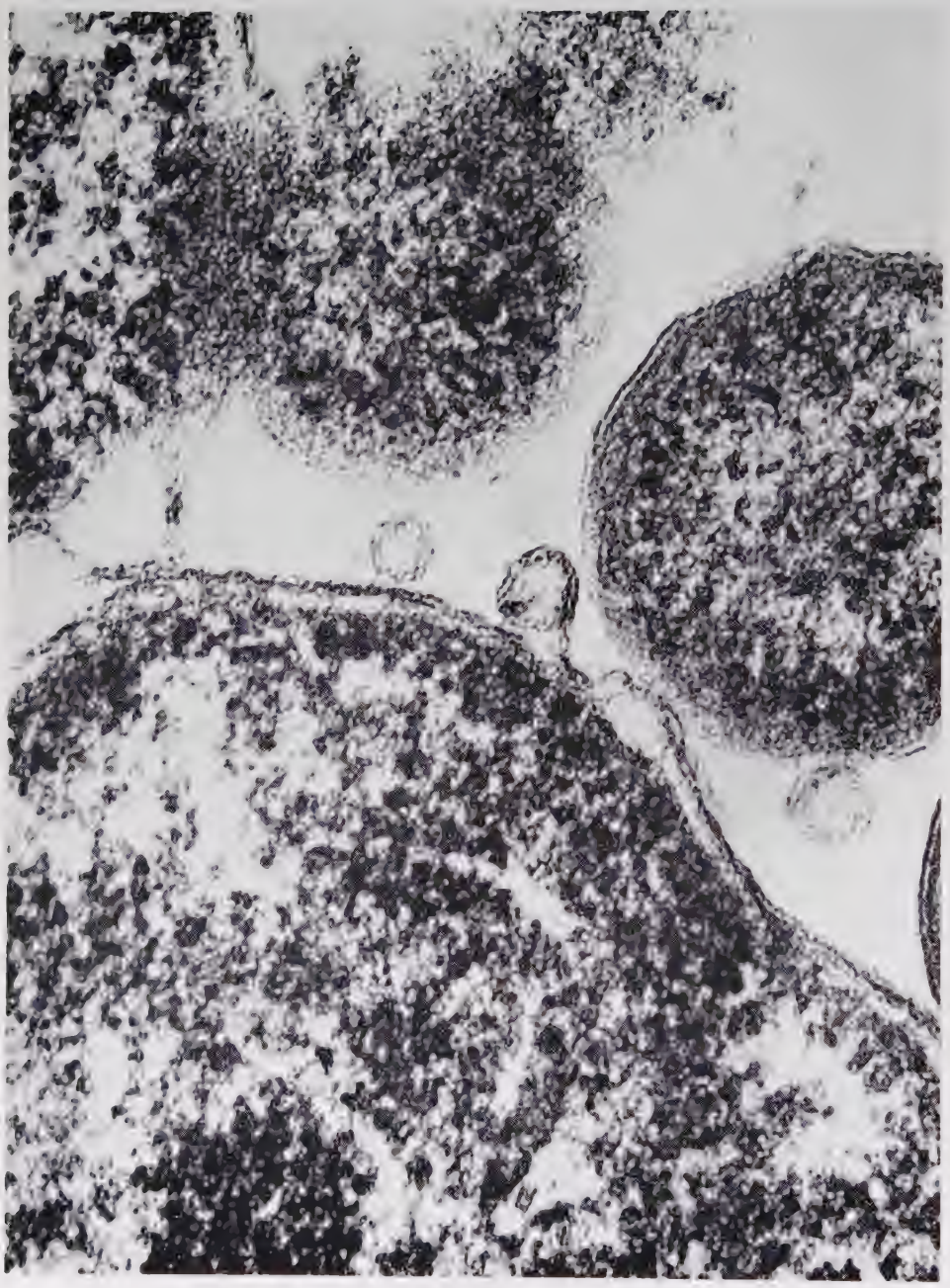


PLANCHE 15
Formation de petites vésicules à partir de la membrane externe du corps initial (G × 300.000).

3.1.6. **Discussion**

L'étude de l'agent de l'ornithose dans les cellules HeLa, macrophages et fibroblastes a montré que l'évolution du cycle de cet agent était identique quelle que soit la cellule-hôte. Ce développement aboutit à la formation d'une inclusion comprenant trois types de particules bien discernables : le corps élémentaire, le corps initial, le corps intermédiaire. Le cycle complexe de développement pourrait être résumé ainsi :

Six heures après l'infection, les seules parties visibles dans le cytoplasme de la cellule-hôte sont des corps intermédiaires et des corps initiaux. Le corps élémentaire, particule infectieuse, a donc, après sa pénétration, subi des modifications profondes.

Vingt-quatre heures après l'infection, les corps initiaux étant beaucoup plus nombreux et constituant la quasi-totalité de la population (90 à 95 %) de l'inclusion, il est nécessaire qu'entre la sixième heure et la vingt-quatrième heure, les corps initiaux, pratiquement seuls présents dans les premières heures, se soient divisés.

Nous n'avons actuellement aucune idée ni de la durée d'une division, ni du nombre de divisions que subit le corps initial avant de se transformer en corps intermédiaire ; cependant, le début de la division du corps initial devrait se situer vers la quinzième heure après l'infection.

Si on considère le nombre de granules R.N.P. qui entre dans la constitution des différentes particules (Pl. 14) on note que le nombre de ces granules est d'environ 30 par section moyenne de corps élémentaires ; ce nombre est assez constant. Dans les corps initiaux, chaque section moyenne comporte environ 50 granules R.N.P. Compte tenu du volume de cette dernière particule, le nombre des granules dans les corps initiaux est donc beaucoup plus important que dans les corps élémentaires, ce qui cadre bien avec la très forte fluorescence orange observée au début de l'infection dans les inclusions constituées exclusivement de corps initiaux. Il faut admettre alors une synthèse de ces éléments dans le corps initial. Elle ne peut se faire qu'à partir de l'ADN issu du nucléoide du corps élémentaire après sa pénétration dans la cellule.

Certains corps initiaux se présentent, comme nous l'avons vu, avec un étranglement médian. L'éventualité d'une fission binaire peut être raisonnablement avancée, compte tenu de la variation observée au niveau de ces structures étranglées (Pl. 16). Nous sommes pour l'agent de l'ornithose en accord avec la majorité des auteurs qui ont étudié le cycle de développement des autres agents du groupe P.L.T. En ce qui concerne les corps intermédiaires et les corps élémentaires, nous n'avons jamais observé de telles images de fission, ce qui diffère sensiblement des conclusions avancées par Anderson (1) concernant Chlamydia psittaci parasitant des cellules épithéliales. Toutefois, il est possible de trouver côte à côte deux corps intermédiaires, de même taille

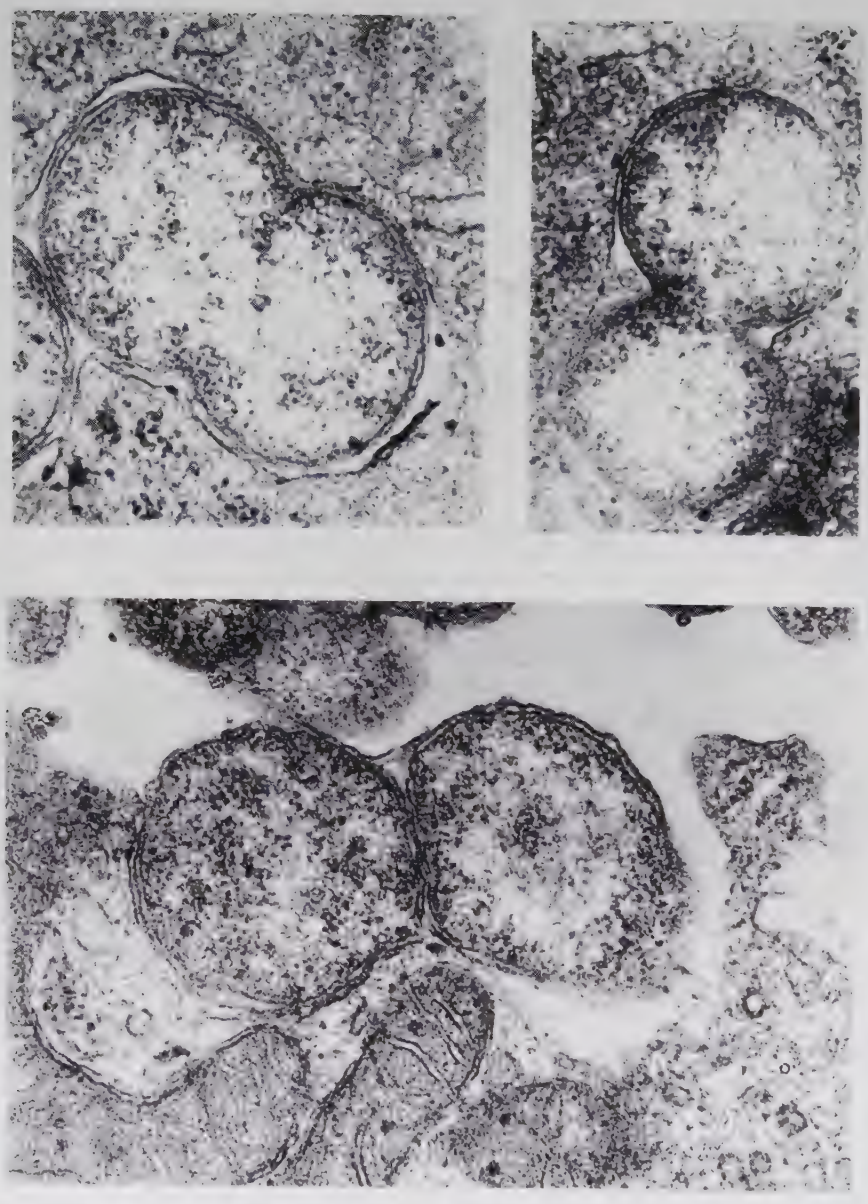


PLANCHE 16

Fission : images de fission binaire à trois stades d'évolution (G × 50.000).

et de même structure, complètement individualisés, ce qui pourrait évoquer deux cellules-filles. De plus, lorsque Chlamydia psittaci parasite une cellule HeLa, on le sait d'origine épithéliale, nous avons observé des corps intermédiaires à deux nucléoïdes au milieu d'autres particules. Ceci ne se rencontre pas dans les macrophages. Il est, d'après ces faits, important de souligner le rôle éventuel joué par la cellule-hôte, dans le cycle de développement de la souche ornithose ; les caractères morphologiques pouvant varier selon qu'il s'agit de macrophages ou de cellules HeLa ou d'autres types de cellules épithéliales (51).

Il semble maintenant certain que la transformation ultérieure du corps initial en corps intermédiaire soit caractérisée par l'apparition d'un nucléoïde central, probablement fait de filaments d'ADN nouvellement synthétisés et regroupés. Les corps intermédiaires se transformeront en corps élémentaires de taille plus réduite, comprenant les trois zones distinctes que nous avons illustrées.

Enfin, en ce qui concerne le glycogène, nous avons dit qu'on pourrait le trouver dans les particules élémentaires. Dans les cellules HeLa, nous rencontrons parfois ce polysacharride dans la vacuole d'inclusion. Ce fait nous paraît intéressant puisque la souche de chlamydia psittaci appartient au sous-groupe B des chlamydiaceae selon Gordon et Quan (Pl. 17, 18, 19).

ÉTUDE CYTOCHIMIQUE

Les résultats ultrastructuraux pour différents agents du groupe des chlamydiaceae précisent que les *corps initiaux* et les *corps intermédiaires* sont limités par « deux unit membrane ». Les avis divergent en ce qui concerne le corps élémentaire, particule infectieuse. En effet, Mitsui et coll. (59) pour l'agent du trachrome, Erlandson et Allen (28) pour celui de la méningopneumonie et Jadin (43) pour l'agent de l'ornithose signalent l'existence d'une seule « unit membrane ». Par contre, Armstrong et Reed (4) pour l'agent de la lymphogranulomatose vénérienne et Anderson (1) pour l'agent de l'ornithose ont montré qu'il existait une membrane plasmatique interne, difficile à mettre en évidence par les fixateurs utilisés.

Compte tenu du caractère fragmentaire des résultats d'Anderson (1), nous avons réétudié ce problème. Il est apparu que le choix du fixateur était déterminant. Nous avons comparé les résultats obtenus avec deux techniques de fixations différentes :

1. la double fixation glutaraldéhyde-tétroxyde d'osmium ;

2. la fixation simple selon Ryter et Kellenberger au tétroxyde d'osmium en tampon veronal.

Ce travail a fait l'objet d'une publication constituant l'annexe N° 5. Nous en rappellerons quelques conclusions :

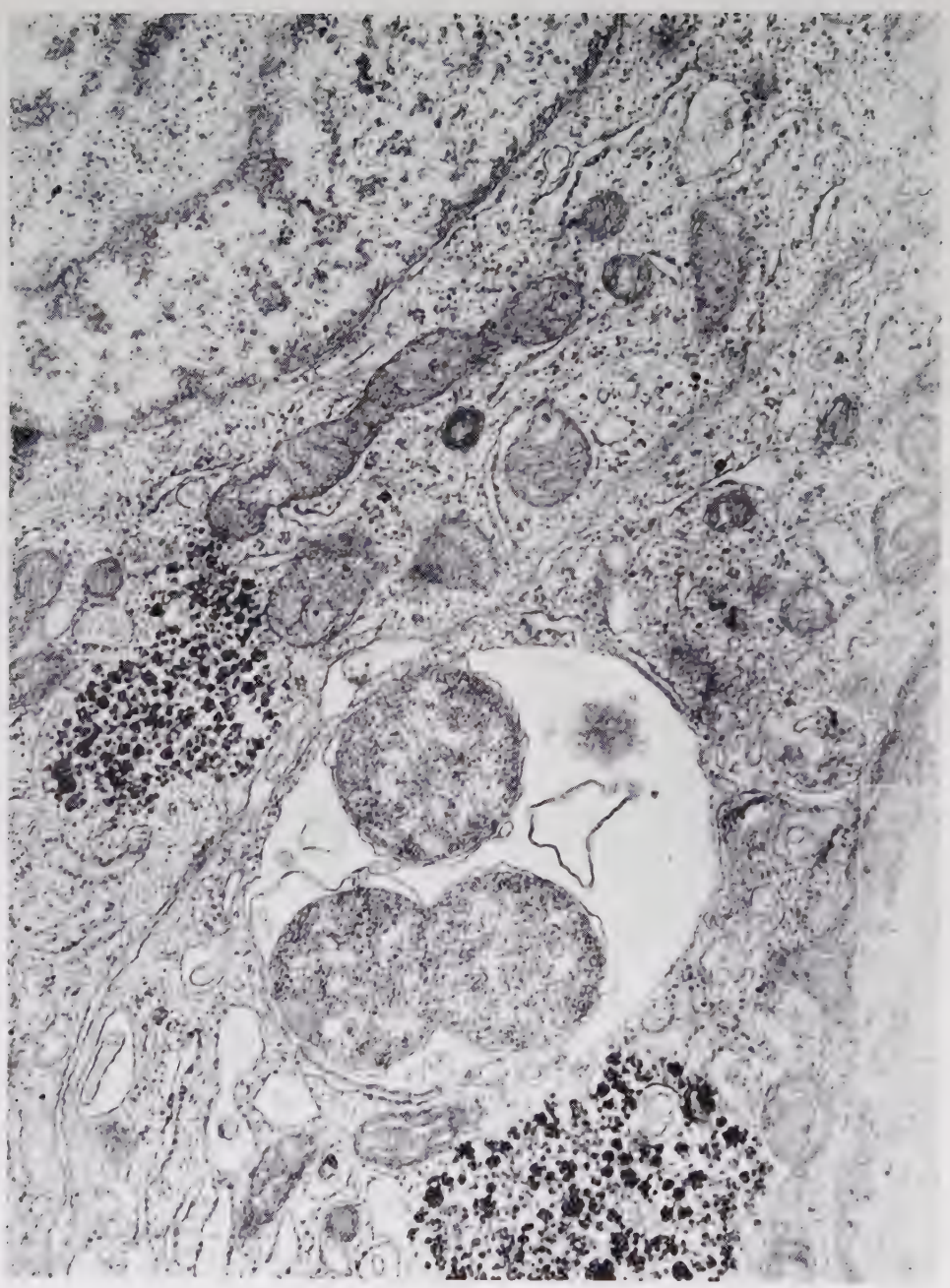


PLANCHE 17

« Morula » dans une cellule HeLa. Noter les amas de glycogène dans le cytoplasme (G × 30.000).

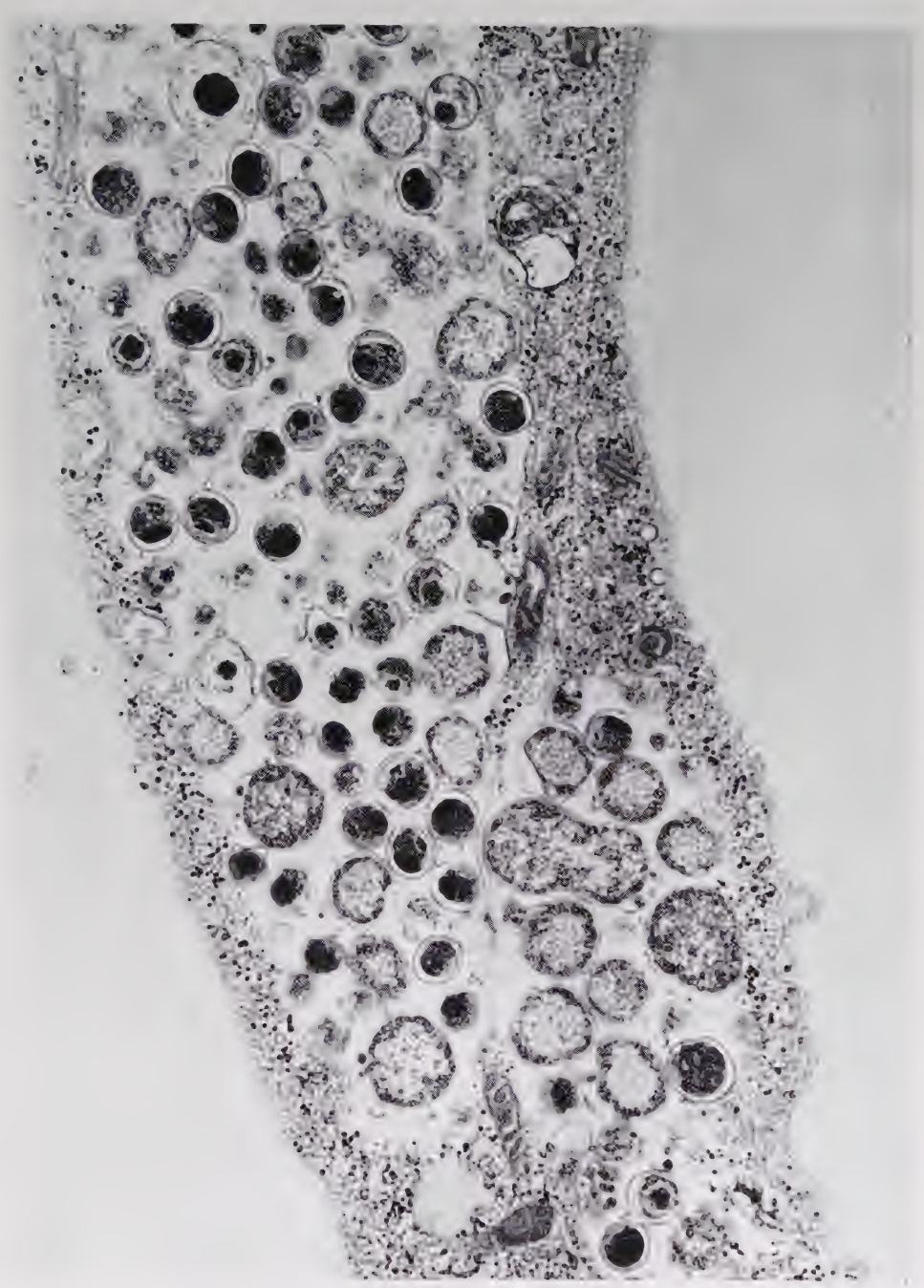


PLANCHE 18
Inclusion dans une cellule HeLa - 72 heures d'infection (G × 10.000).

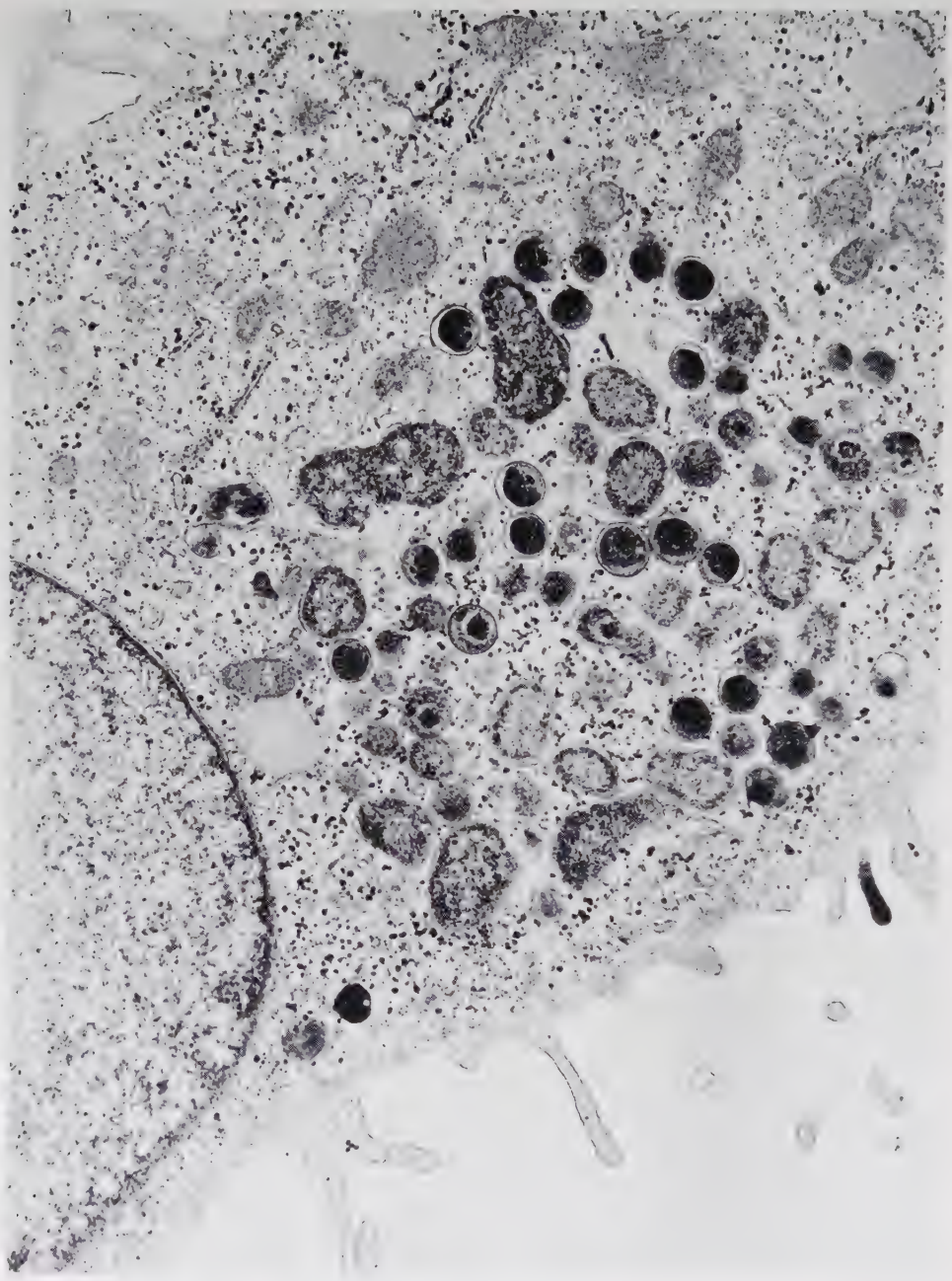


PLANCHE 19

Inclusion dans une cellule HeLa à la 72e heure d'infection. Noter le glycogène à l'intérieur de l'inclusion (G × 10.000).

La fixation, selon Ryter et Kellenberger, permet d'obtenir un meilleur contraste des membranes (Pl. 20). En outre, alors que la « unit membrane » interne se voit mal ou inconstamment après double fixation, dans la particule élémentaire, elle est toujours bien visible après fixation au tétroxyde d'osmium en tampon veronal. De plus, alors que l'épaisseur des membranes varie avec le type de particule en double fixation, elle est constante en fixation simple selon Ryter et Kellenberger. Concluons donc, en contradiction avec Jadin, mais en accord avec les résultats partiels d'Anderson, que les corps élémentaires apparaissent toujours limités par deux « unit membrane » très distinctes dont l'épaisseur, c'est une notion nouvelle, est constante du corps initial au corps élémentaire. Nous avons, avec cette fixation, parfois noté pour certains corps élémentaires la présence de membranes spiralées rappelant les images décrites par Erlandson et Allen (28) pour l'agent de la méningo-pneumonie.

L'existence d'une variabilité de la membrane interne entre le corps initial et le corps élémentaire, selon la fixation utilisée, implique l'existence probable d'une différence de composition de cette membrane au cours de l'évolution du corps initial vers le corps élémentaire. C'est pourquoi nous avons appliqué à ces membranes les techniques de mise en évidence des polysaccharides et des glycoprotéides.

— *Mise en évidence des polysaccharides par la technique de Seligman et Thiery*

Après un temps réduit d'incubation par la thiosemicarbazine (35 mm), la réponse est pratiquement négative (Pl. 21 - fig. 1). Nous notons seulement la présence à l'intérieur de la particule de grosses granulations hétérogènes, jusqu'à 8 sur une section, mesurant approximativement 220 Å et chacune formée de sous-unités de 40 à 45 Å environ. Les préparation soumises à l'action de l'alpha-amylase préalablement testée quant à son activité spécifique ne montrent qu'une digestion très partielle et inconstante de ces granulations (Pl. 21 - fig. 2, 3).

Après 24 heures d'incubation par la thiosemicarbazine, les membranes du corps initial et du corps intermédiaire sont légèrement plus denses aux électrons ; celles du corps élémentaire apparaissent fortement colorées (Pl. 22). En particulier, la membrane interne est marquée par une bande sombre de 100 à 200 Å d'épaisseur.

Il existe donc, au cours de la formation du corps élémentaire, une charge en polysaccharides au niveau des membranes. Elle paraît plus importante au niveau de la « unit membrane » interne et ne dépasse jamais le feuillet interne de la « unit membrane » externe ; elle peut remplir complètement l'espace compris entre les deux « unit membrane ».

Avec la technique de Rambourg, nous obtenons également une réaction positive au niveau des membranes du corps élémentaire avec les mêmes

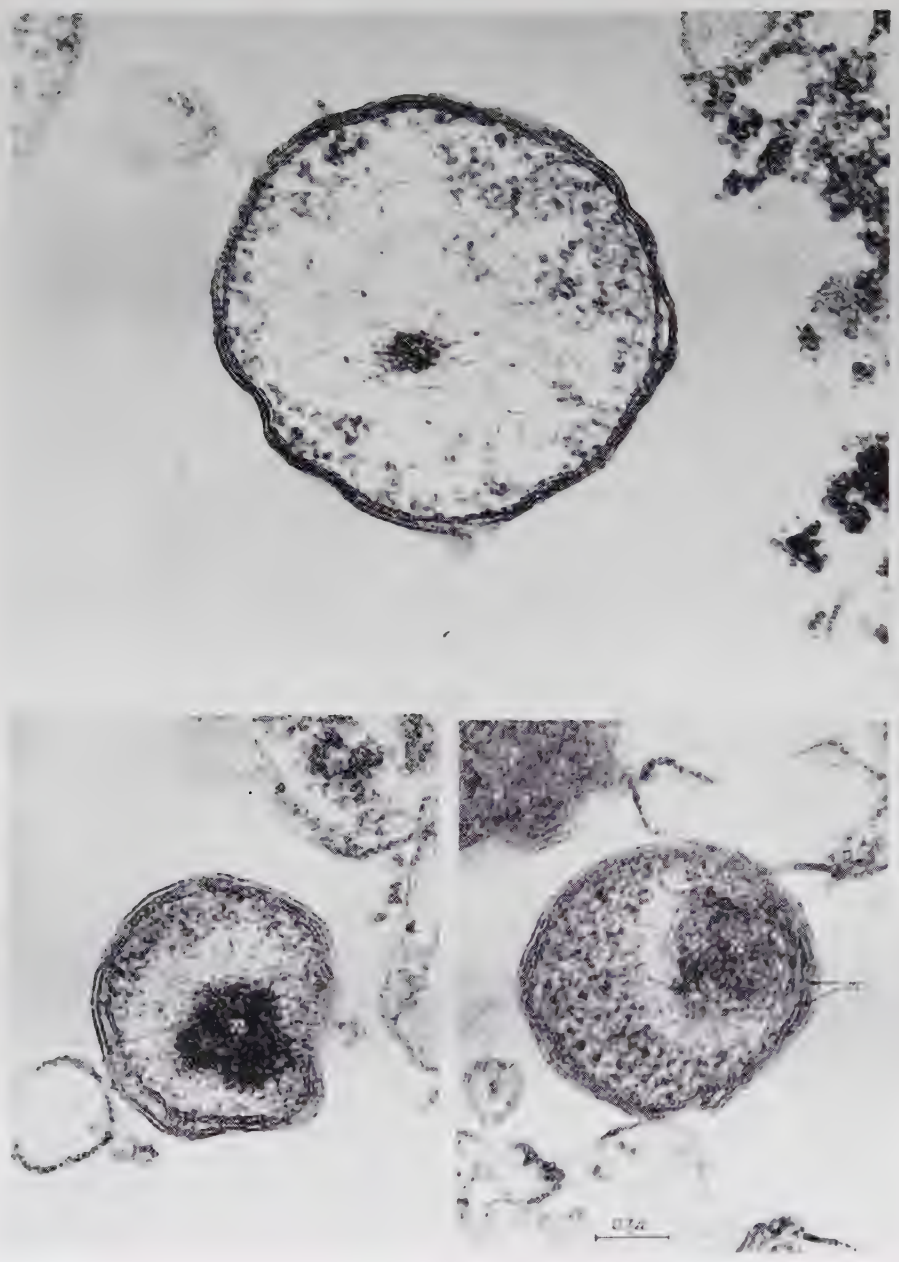


PLANCHE 20

Particules de l'agent de l'ornithose après fixation de Ryter et Kellenberger. Noter les membranes bien visibles du corps élémentaire (G × 150.000).

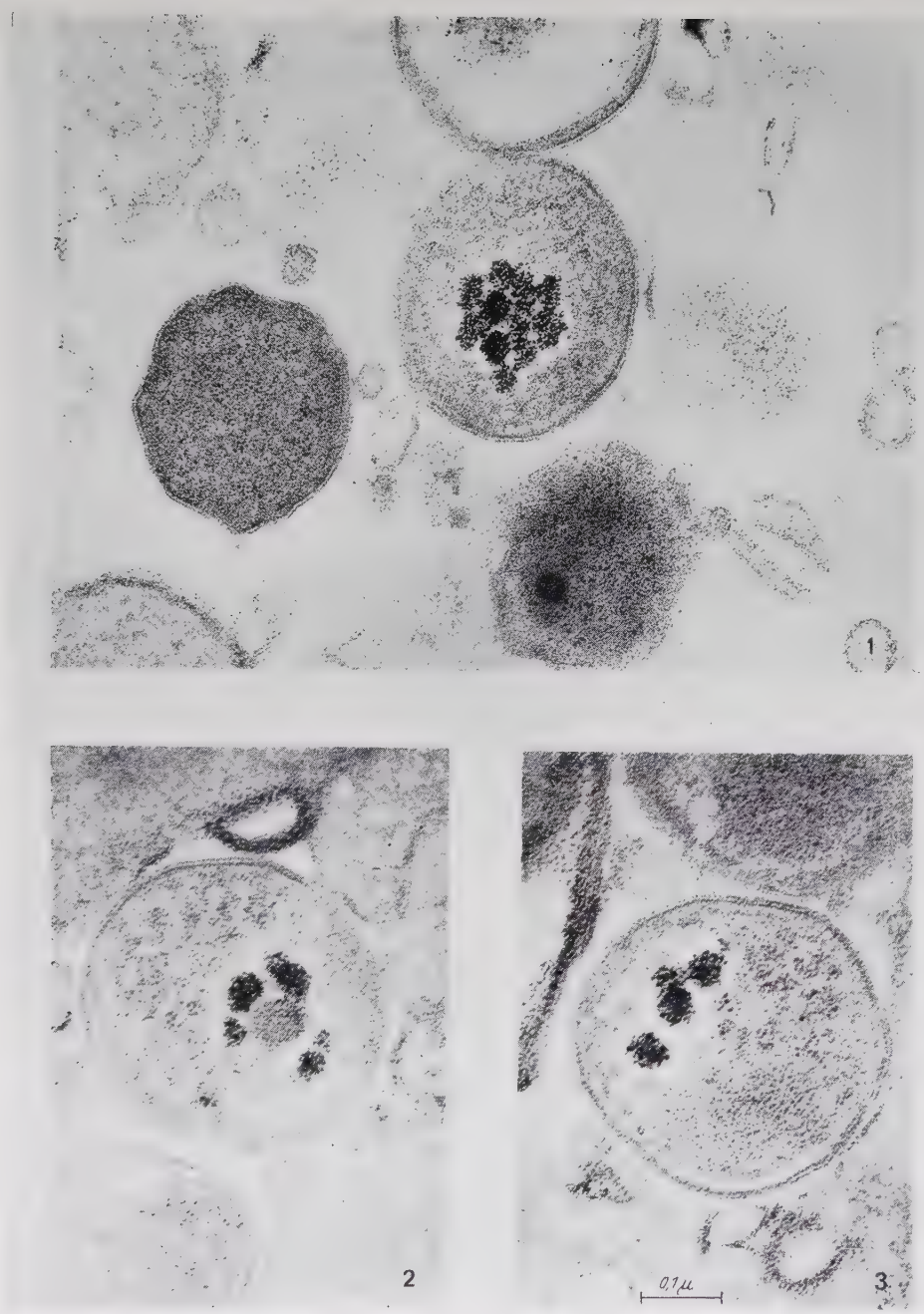


PLANCHE 21

Fig. 1. — *Réaction de Seligman et Thiéry après 35 minutes d'incubation à la thiosemicarbazine. La réaction est négative au niveau des membranes.*

Fig. 2-3. — *Réaction de Seligman et Thiéry après action de l'alpha amylase. La digestion des grosses particules n'est que partielle.*

(G × 150.000)

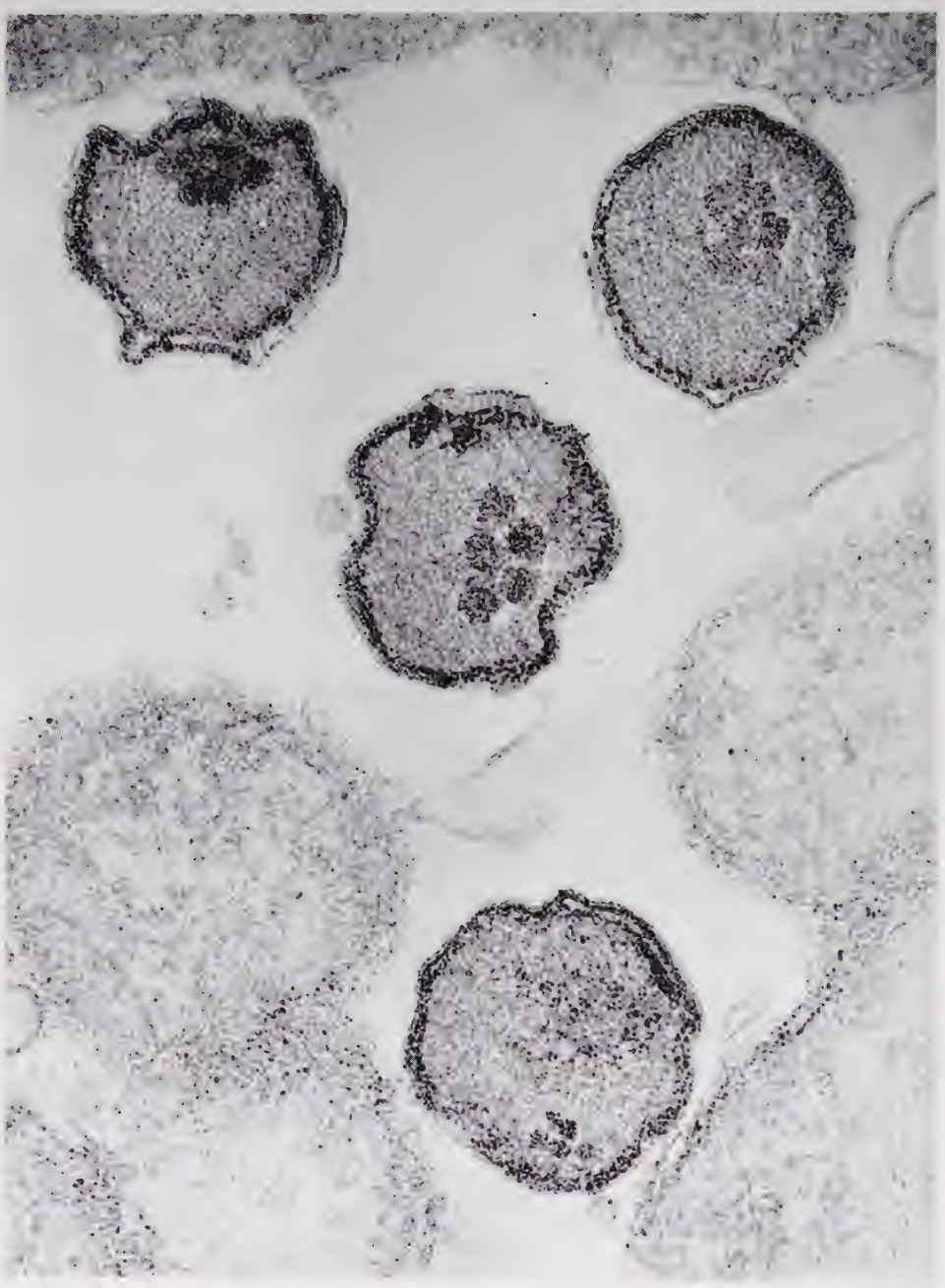


PLANCHE 22

Réaction de Thiéry après 24 *heures d'incubation avec la thiosemicarbazine. Noter la positivité de la membrane interne du corps élémentaire* (G × 30.000).

particularités, la coloration portant essentiellement sur la « unit membrane » interne.

DISCUSSION

Les variations de visibilité et de densité de la membrane interne des particules élémentaires, selon les fixations utilisées, permettent de supposer l'existence d'une différence de composition chimique de cette membrane par rapport à la membrane externe. De ce point de vue, Perkins et Allison (71) ont souligné que le corps élémentaire des agents du groupe P.L.T. acquiert, au cours de sa maturation une paroi rigide que ne possède pas le corps initial.

Jenkin (44) avait, de son côté, affirmé que les membranes isolées de la particule élémentaire de la méningo-pneumonie contenaient de l'acide muramique. Erlandson et Allen (28) ont même supposé que l'acide muramique était localisé dans la zone claire comprise entre les deux « unit membranes ». Les études biochimiques comparées de Tamura et Manire sur des préparatins purifiées de corps initiaux (91) et de corps élémentaires (53) obtenus à partir de l'agent de la méningo-pneumonie ont précisé la nature biochimique des constituants membranaires, qui ne contiennent ni acide muramique, ni acide diaminopimélique. En outre, la glucosamine et la galactosamine ne sont représentées que dans les membranes du corps élémentaire ; le corps initial n'en contient pas. Aucune conclusion semblable ne peut être tirée en ce qui concerne l'agent de l'ornithose dont l'analyse biochimique des membranes isolées n'a pas encore été entreprise. Cependant et pour la première fois, la présence de polysaccharides, tels que nous les avons révélés par la réaction de Seligman modifiée par Thiery (95), fait apparaître très nettement cette différence de composition chimique, au cours du développement, des membranes du corps élémentaire de l'agent de l'ornithose. Ajoutons qu'en ce qui concerne les autres agents du groupe P.L.T., aucune étude cytochimique ultrastructurale de ce type n'a encore été faite.

— *Etude enzymatique*

L'étude enzymatique de la structure interne des particules de l'agent de l'ornithose a été limitée à celle des corps élémentaires contenus dans des cellules macrophages infectées depuis 72 heures. Les enzymes ribonucléase et déoxyribonucléase ont été appliquées sur coupes flottantes après fixation et inclusion au glycolméthacrylate des cellules parasitées.

La ribonucléase en 30 minutes fait disparaître les granules de 150 Ä (Pl. 23-24). Nous obtenons également une disparition de ces granules et une perte de densité de la zone où ils sont localisés par l'action conjuguée de la pepsine et de la ribonucléase (Pl. 25). *Nous pouvons donc dire que cette zone granulaire contient du RNA*. La taille de ces granulations autorise à penser qu'il s'agit de ribosomes confirmant, comme nous l'avons précisé plus haut, les observations de Tamura et Anderson.

L'action de la désoxyribonucléase laisse intacte la partie ribosomale mais digère, bien qu'incomplètement, le nucléoïde (Pl. 26-27). On connaît la variabilité d'action de la désoxyribonucléase sur les structures de D.N.P. ; cependant, les résultats suivants permettent, nous allons le voir, d'affirmer la présence de DNA :

Si nous reprenons un témoin ribonucléase, nous notons une certaine densité aux électrons de ce nucléoide. Après action de la ribonucléase, on observe une surcoloration de ce nucléoide due à une fixation non spécifique de l'enzyme sur le DNA comme le montre, pour la première fois, sur des levures Yotsuyanagi (103) (Pl. 23-24).

Par ailleurs, si nous utilisons, selon Bernhard (15), la technique de coloration régressive par action de l'EDTA sur des coupes préalablement surcolorées par l'acétate d'uranyl, nous notons une décoloration de ce nucléoïde (Pl. 28-29). Les ribosomes, par contre, apparaissent plus contrastés. *Ce faisceau d'arguments souligne bien l'existence de DNA dans ce nucléoïde.* On peut considérer que cette étude enzymatique confirme certains travaux biochimiques antérieurs effectués sur d'autres agents du groupe, montrant la présence à la fois d'acide désoxyribonucléique et de l'acide ribonucléique dans chaque particule et permettant, de plus, d'en préciser la localisation. Ajoutons que c'est la première fois qu'une étude cytochimique et cytoenzymologique d'un des agents du groupe des chlamydiaceae est entreprise.

3.2. ÉTUDE DYNAMIQUE A L'AIDE DE LA MICROCINÉMATOGRAPHIE A CONTRASTE DE PHASE DANS LES CELLULES FIBROBLASTIQUES

3.2.1. Etude des cellules normales

Après la mise en culture des explants conjonctivo-musculaires d'embryons de poulet, les fibroblastes migrent et se divisent. Ils sont bien étalés entre la lamelle porte-objet et la membrane de dialyse.

A la quarante-huitième heure de culture, on dispose d'une couche mince de cellules à distance de l'explant et facilement observables sans halo de diffraction ; les cellules se présentent alors avec un cytoplasme très clair, contenant des chondriocontes dont les mouvements sont conformes aux descriptions classiques (31). Quelques granulations lipidiques réfringentes peuvent être distinguées grâce à leur centre plus clair, petit et très dense ; d'autres granules sont de nature probablement lysosomale, ces derniers émettent en effet dans le proche ultra-violet une radiation jaune orangée, après incubation des cellules vivantes dans une solution d'acridine orange. Le noyau, important, comporte un ou plusieurs nucléoles lobulés pelotonnés et de densité hétérogène.

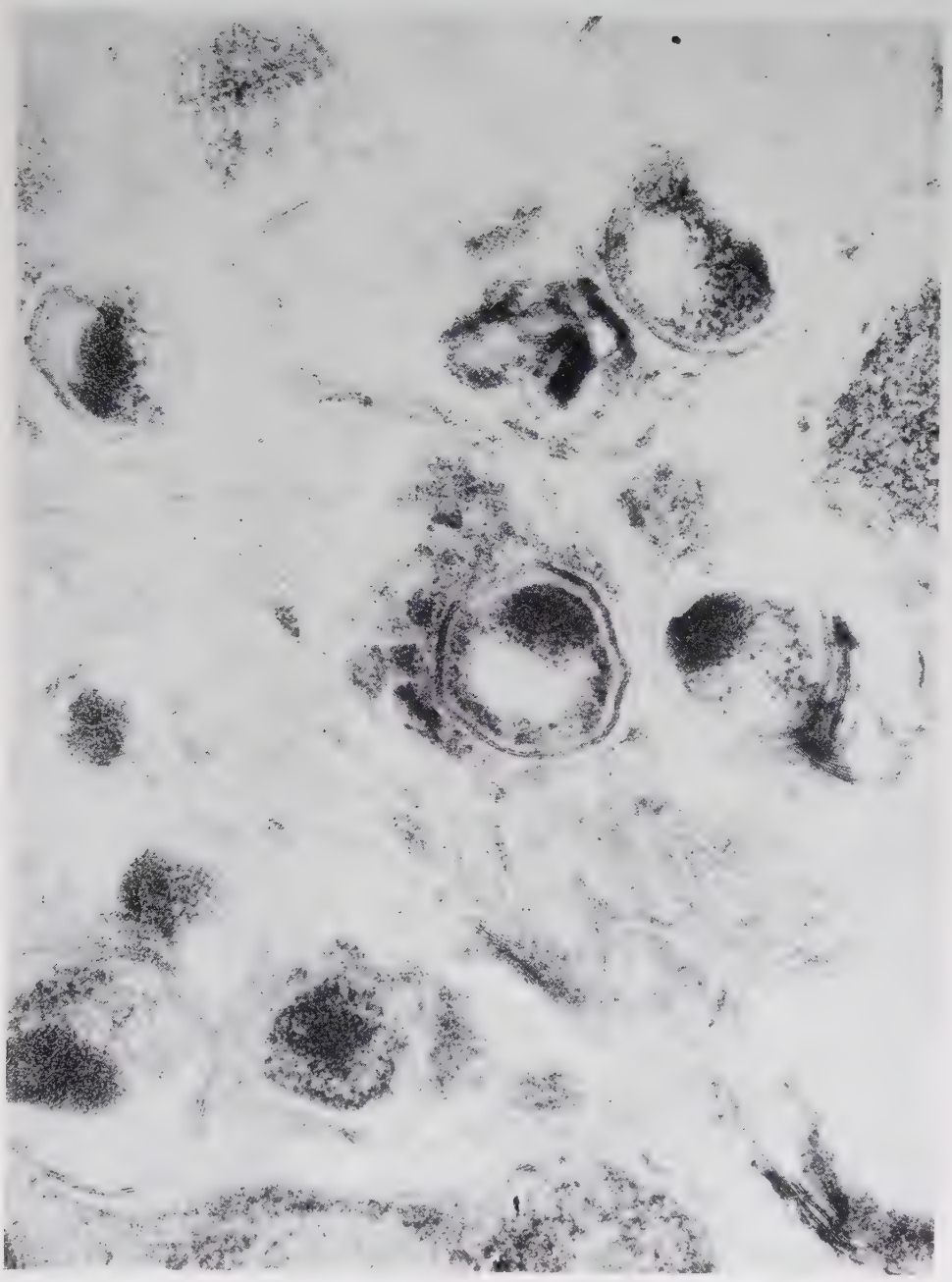


PLANCHE 23
Témoin pour l'action de la RNAse (G × 30.000).

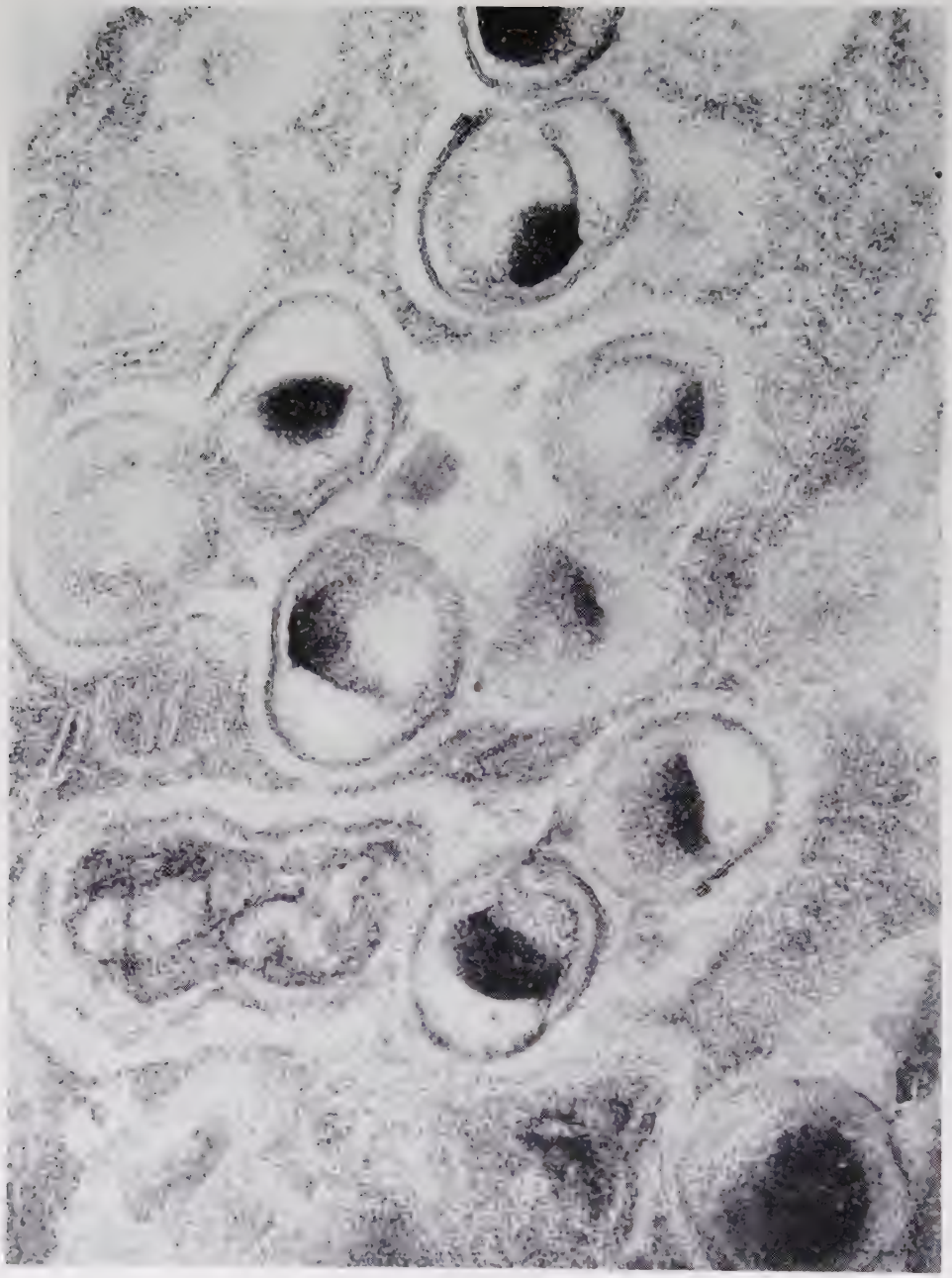


PLANCHE 24

Action de la RNAse, 30 *mn - Digestion de la zone granuleuse* (G × 30.000).

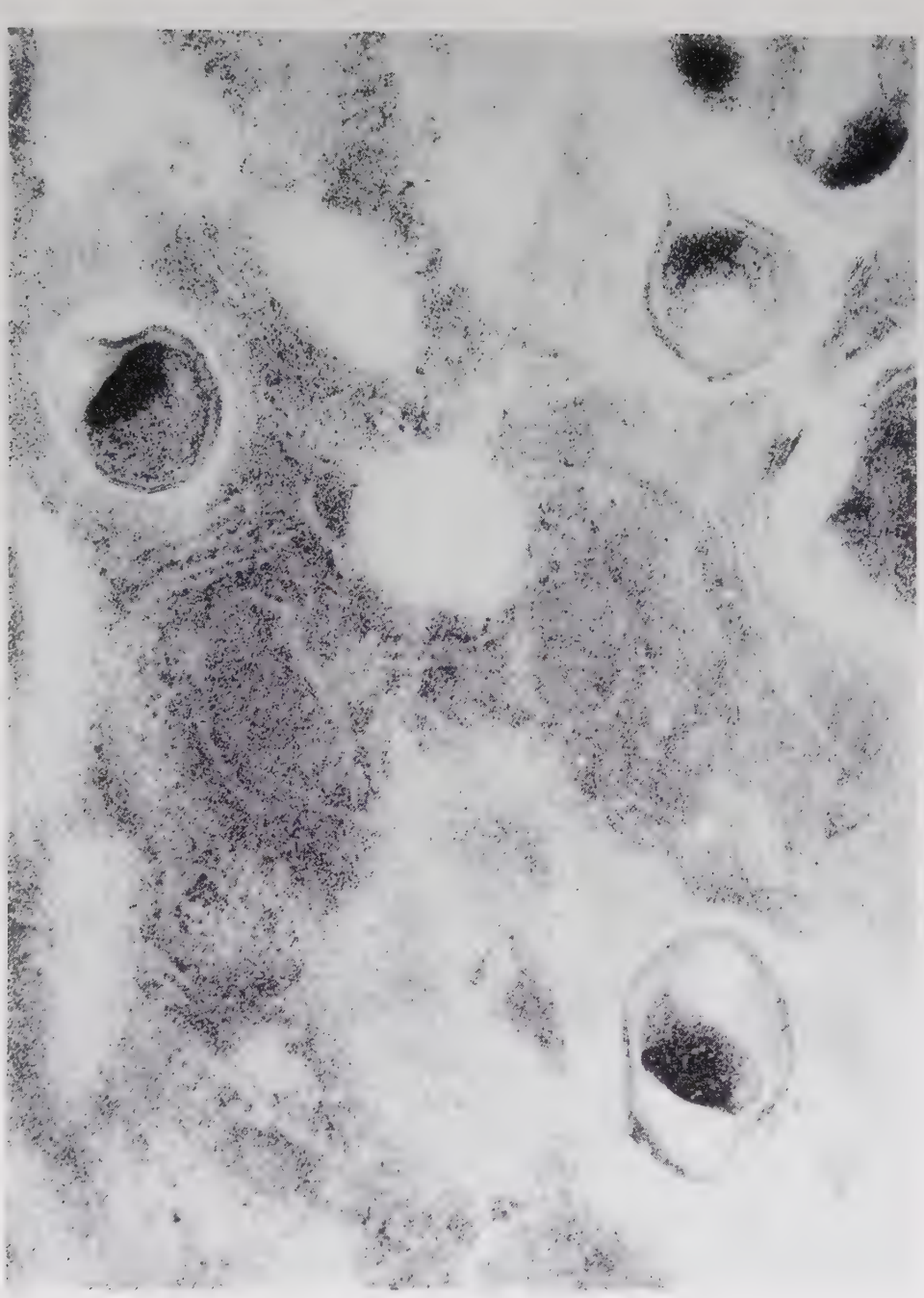


PLANCHE 25

Action conjuguée de la pepsine et de la RNAse, 30 mn. Disparition de la zone granuleuse du corps élémentaire (G × 30.000).

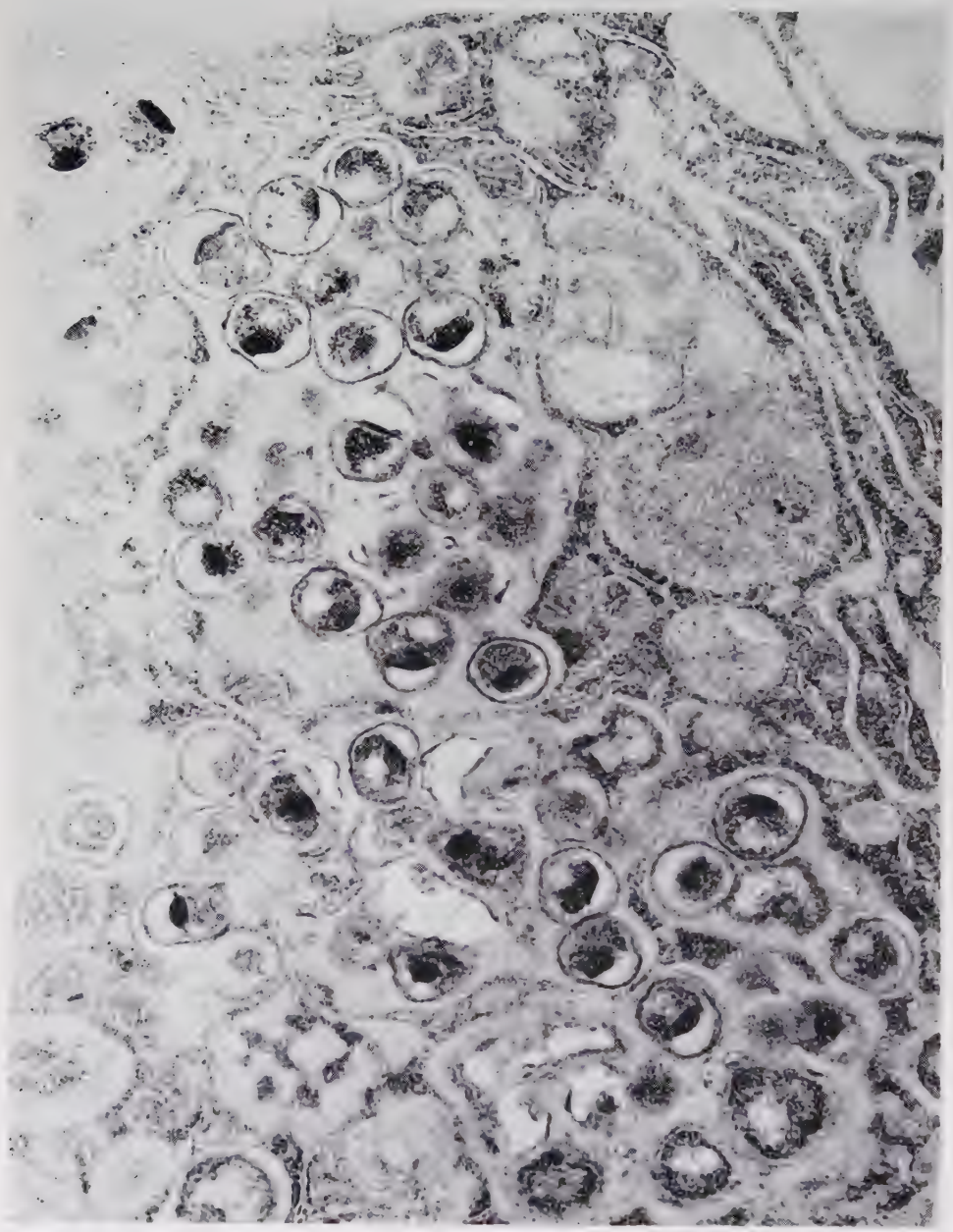


PLANCHE 26

Action de la DNAse 4 heures sur macrophage, à la 72e heure d'infection. Digestion partielle du nucléoïde (G × 10.000).

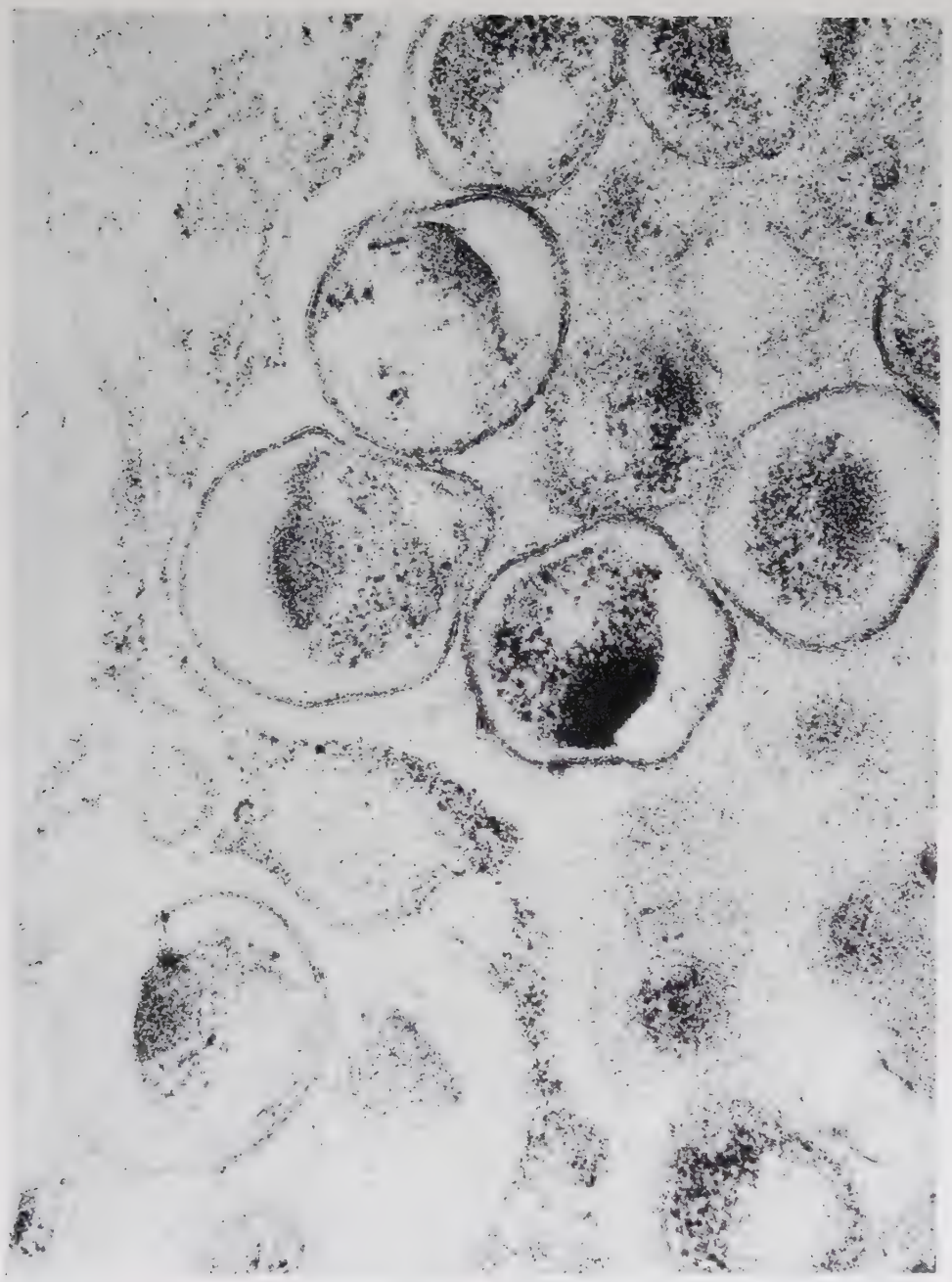


PLANCHE 27

Action de la DNAse 4 *heures - Fort grossissement* (G $\times$ 90.000).

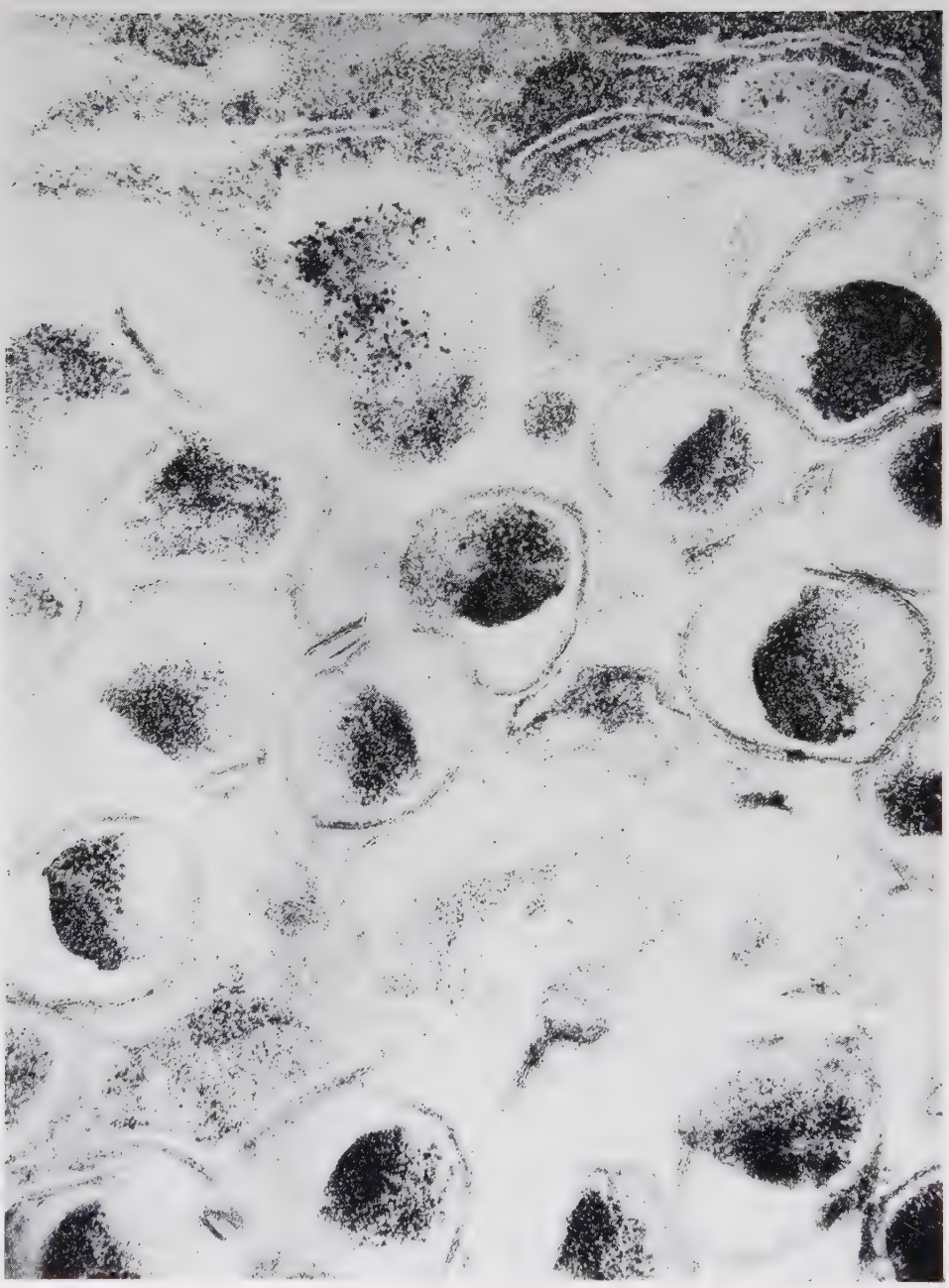


PLANCHE 28
Témoin pour la coloration régressive (G × 30.000).

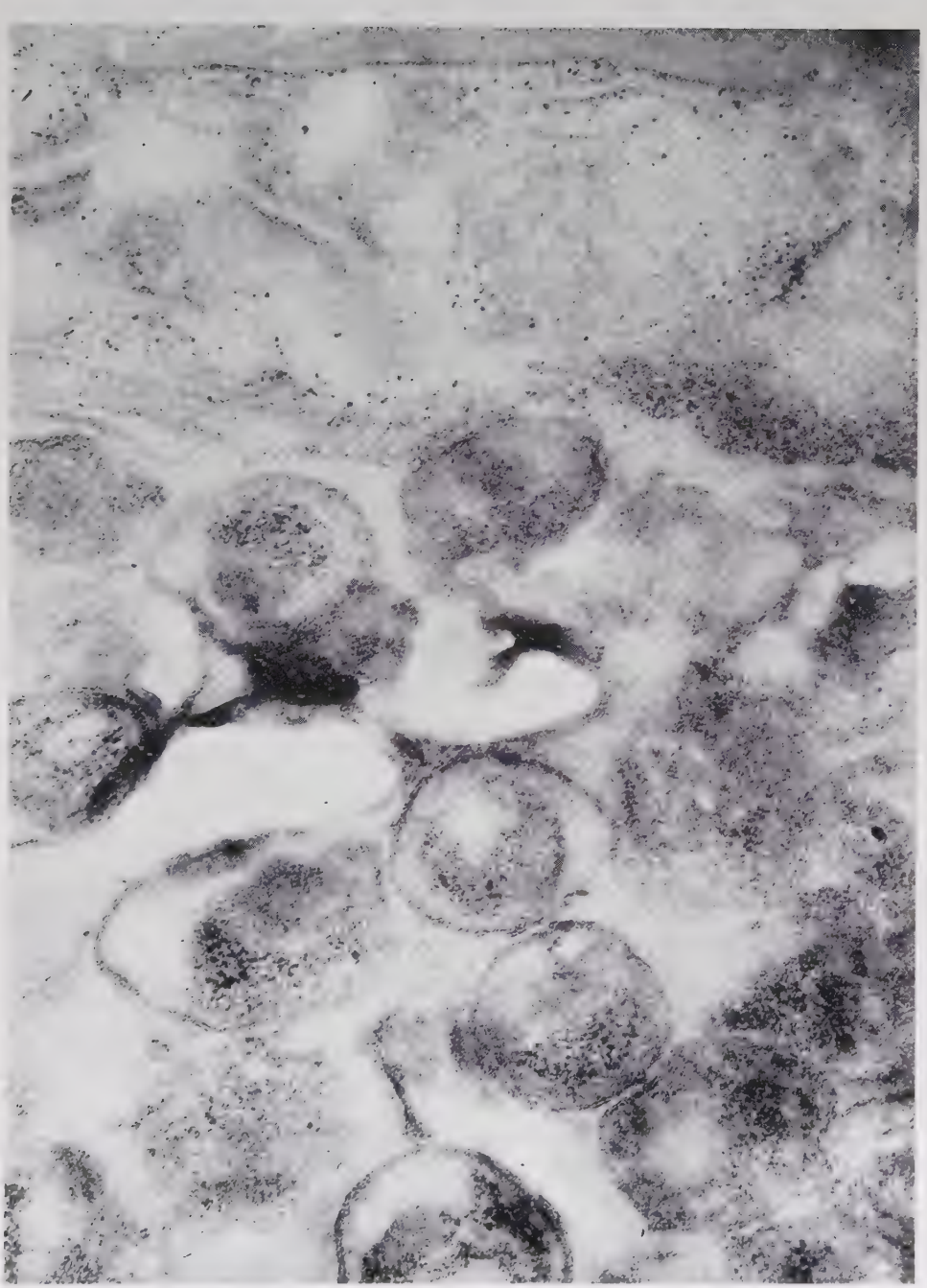


PLANCHE 29

Disparition du DNA du nucléoïde par la coloration régressive (G × 30.000).

Les cellules de lignée BHK présentent une morphologie un peu différente. Les mitochondries sont plus fines et les nucléoles plus réguliers et plus homogènes.

3.2.2. **Examen des cellules infectées**

Quel que soit le système de culture et d'inoculation utilisé, la microscopie ordinaire ne permet pas de repérer l'agent infectieux dans les douze premières heures suivant l'inoculation. Les cellules parasitées ne diffèrent pas des cellules normales. En effet, l'élément microbien infectieux à la limite de la visibilité optique ne peut être distingué des autres constituants cellulaires.

Il n'a donc pas été possible de suivre la captation de ces particules par les membranes cytoplasmiques et leur devenir dans les tout premiers stades de l'infection. Nous avons tenté de marquer ces éléments afin de mieux les repérer en utilisant différents fluorochromes : la fluorescéine et l'orangé d'acridine :

a) en injectant le marqueur immédiatement après le montage des cellules infectées, dans la chambre ;

b) en incubant les cellules infectées avec de l'orangé d'acridine (concentration finale 10-5) ;

c) en marquant l'inoculum lui-même avec l'orangé d'acridine (concentration finale 10-5).

Ces procédés ont nécessité une mise au point technique pour associer le contraste de phase et la lumière U.V. sur les cellules vivantes.

Les résultats ont été négatifs pour l'étude des premiers stades la technique ayant soulevé différentes difficultés :

— l'orangé d'acridine ne traverse pas la cellophane,

— la cellophane est auto-fluorescente,

— l'orangé d'acridine diffuse dans toute la cellule,

— nous n'obtenons aucune fluorescence spécifique.

3.2.3. **Résultats des enregistrements cinématographiques**

C'est seulement aux environs de la quinzième heure qu'apparaît dans le cytoplasme une formation granuleuse, sphérique de 2 à 2,5 μ de diamètre. Elle va rapidement se déplacer vers la région périgolgienne, augmenter de volume et se densifier (Pl. 30). A un fort grossissement, elle apparaît, dans les

tout premiers stades observables, constituée par plusieurs éléments sphériques, cinq environ, accolés les uns aux autres (Pl. 31 - fig. 1). Nous avons pu mesurer leur diamètre, il est d'environ 0,5 à 0,8 μ. En comparant ces données aux résultats de la microscopie électronique, nous pouvons affirmer qu'il s'agit d'une « morula » rassemblant des particules qui correspondent aux corps initiaux comme nous l'avons démontré ailleurs.

De la vingtième heure à la trentième heure après l'infection, la morula grossit. Elle est dense, compacte, peu mobile à l'intérieur du cytoplasme. Au contact de certaines inclusions, on peut noter la présence de granules optiquement très denses qui, par leur taille, pourraient être les lysosomes (Pl. 32 - fig. 1).

Un peu plus tard, l'inclusion, plus volumineuse, est constituée d'éléments plus petits de 0,4 à 0,6 μ de diamètre, (Pl. 32 - fig. 3) bientôt animés de mouvements. Il faut remarquer que ces mouvements ont été observés à partir d'enregistrements image par image projetés à 24 images par seconde donc avec une accélération de 720 fois, ils sont ainsi relativement lents. Cette évolution de la population microbienne se fait en une heure environ et survient vers la trentième heure après le début de l'infection.

L'apparition de ces éléments de plus petite taille correspond au début de la transformation des corps initiaux en corps intermédiaires puis élémentaires. En effet, la microscopie électronique montre que l'inclusion est alors constituée de trois types de particules ; pendant tout le temps de la vie intracytoplasmique, les corps initiaux se divisent. Ils donnent naissance aux corps intermédiaires, qui évolueront en corps élémentaires, possédant un nucléoïde paracentral et des ribosomes au sein d'un matériel granulo-fibrillaire. Toutefois, il est à noter que des corps initiaux sont présents jusqu'à la fin de l'évolution de l'inclusion impliquant, ou bien que certains d'entre eux ne se sont pas encore divisés, ou bien qu'ils ne peuvent le faire. L'hypothèse de la transformation, à l'intérieur d'une inclusion déjà évoluée, d'un corps élémentaire ou intermédiaire en corps initial paraît peu vraisemblable.

De la quarante-huitième heure à la soixante-douzième heure environ, l'inclusion devient progressivement plus importante, entourant le plus souvent la région centro-cellulaire. Parfois, elle refoule le noyau, enserre et réduit l'appareil de golgi, limitant à une mince couronne périphérique le cytoplasme dans lequel sont encore visibles les mouvements du chondriome.

Dans cette grande inclusion granuleuse, dense, très rapidement des zones de densité optique relativement plus faible se délimitent, suggérant la formation de petites vacuoles (Pl. 32). Elles semblent apparemment libres de particules. L'observation au microscope interférentiel selon Nomarski (68) donne de ces zones claires des images dont la pente optique est inverse de celle du nucléole,, signifiant que le rapport des indices de réfraction de cette structure et du milieu environnant est, pour une épaisseur donnée, inverse du

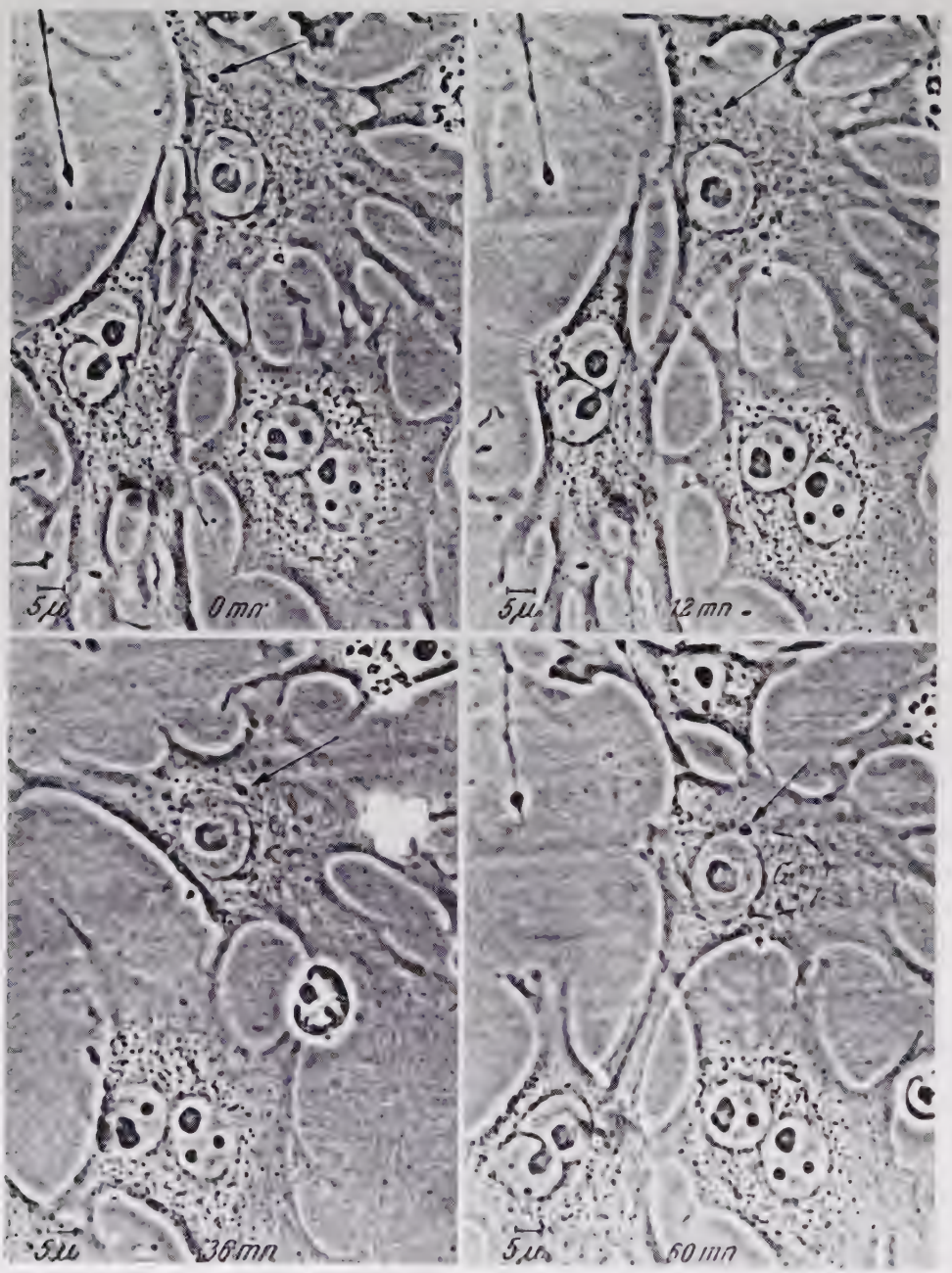


PLANCHE 30

Début de l'infection : apparition de la morula qui migre de la périphérie à la région périgolgienne.

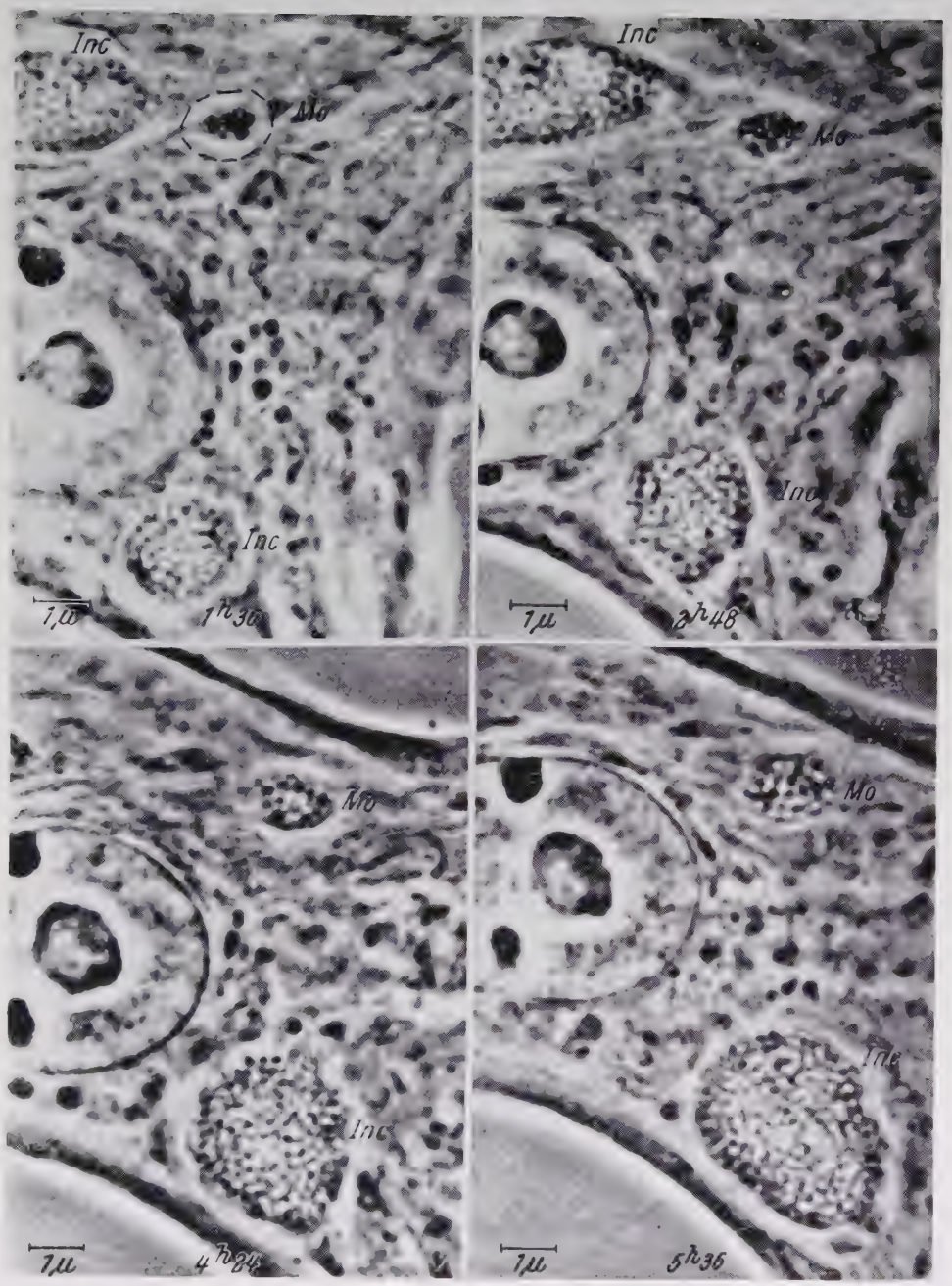


PLANCHE 31

Premiers stades observables de la morula dans une cellule déjà parasitée.

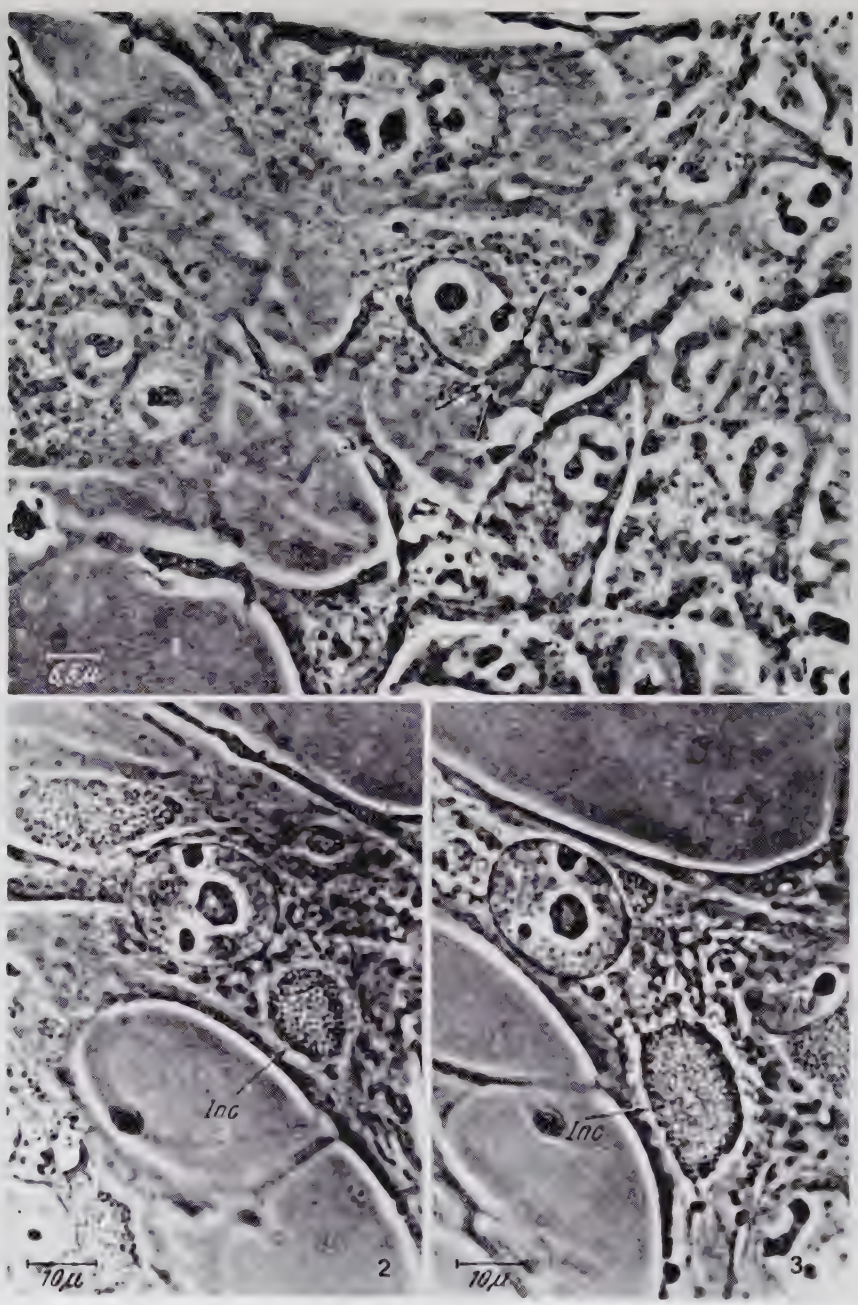


PLANCHE 32

Fig. 1. — *Inclusion à la 21e heure d'infection.*
Noter les lysosomes venant au contact de l'inclusion.
Fig. 2-3. — *Inclusion à la 29e et 37e heure d'infection.*
Noter les différences de taille entre les particules de la morula et de l'inclusion à un même temps d'observation, entre les particules de deux inclusions à des stades différents.

rapport nucléole-noyau. On peut en déduire que l'indice de ces zones claires est plus faible que celui du hyaloplasme, donc qu'il existe dans l'inclusion un état de solation. Bientôt les « petites vacuoles » confluent et l'ensemble de l'inclusion n'est plus qu'une seule vacuole.

La libération des particules survient selon des modalités différentes, liées pour une grande part à l'état de la cellule-hôte. Dans certains cas, une constriction d'ensemble précède de peu l'éclatement de l'inclusion et la dispersion des particules (Pl. 33). Dans d'autres cas, la mince bande cytoplasmique qui sépare l'inclusion de la membrane cellulaire se rompt et entraîne la sortie de toute la population microbienne (Pl. 34).

Dans d'autres exemples, la cellule contient plusieurs inclusions (Pl. 35). Elles sont le siège d'une vacuolisation progressive (*V*). Les inclusions complètement vacuolisées peuvent ensuite confluer par fusion de leur membrane limitante (*Fu*). Le noyau et l'appareil de golgi restent visibles, mais des signes de souffrance apparaissent qui préfigurent la mort cellulaire.

Enfin, dans un dernier type d'évolution, les vacuoles paraissent optiquement vides, seule leur face interne est tapissée d'éléments de la taille des corps initiaux, ce que confirment les images obtenues en microscopie électronique. Il semble que, dans ce dernier cas, les corps élémentaires aient déjà quitté la cellule infectée sans que l'on connaisse toutefois le mécanisme de leur départ, peut-être par fusion de la membrane entre celle de la vacuole d'inclusion et la membrane plasmique et constitution d'un canalicule de sortie. Finalement, la vacuole disparaît et son contenu se répand dans la phase hyaloplasmique liquéfiée de la cellule, dès après la mort de celle-ci.

Lors de l'analyse détaillée de l'ensemble des séquences enregistrées, nous avons noté quelques cas particuliers :

Certaines cellules parasitées possèdent simultanément deux morula. Celles-ci sont quelquefois diamétralement opposées de part et d'autre du noyau de la cellule-hôte. Dans d'autres cellules, deux morula très proches l'une de l'autre confluent. Par ailleurs, il est possible que des cellules parasitées se divisent. Leur mitose ne semble pas perturbée par la présence de l'inclusion. En général, les deux cellules-filles entraînent avec elles une partie de l'inclusion dont le volume varie en fonction de la position du plan de division du cytoplasme. Il peut se faire que la division de la cellule-hôte survienne au début de l'infection alors que la morula vient de se constituer ; celle-ci se retrouvera dans une seule des deux cellules-filles. Son développement se poursuivra normalement jusqu'à la formation d'une inclusion typique.

Enfin, dans certains cas, vers la soixante-douzième heure après l'infection, il n'est pas rare de rencontrer dans une même cellule plusieurs inclusions dont le développement est asynchrone (Pl. 32 - fig. 2). C'est ainsi qu'il est possible d'observer, à côté d'inclusions déjà très évoluées, la constitution d'une morula comprenant des granules homogènes dont la taille correspond

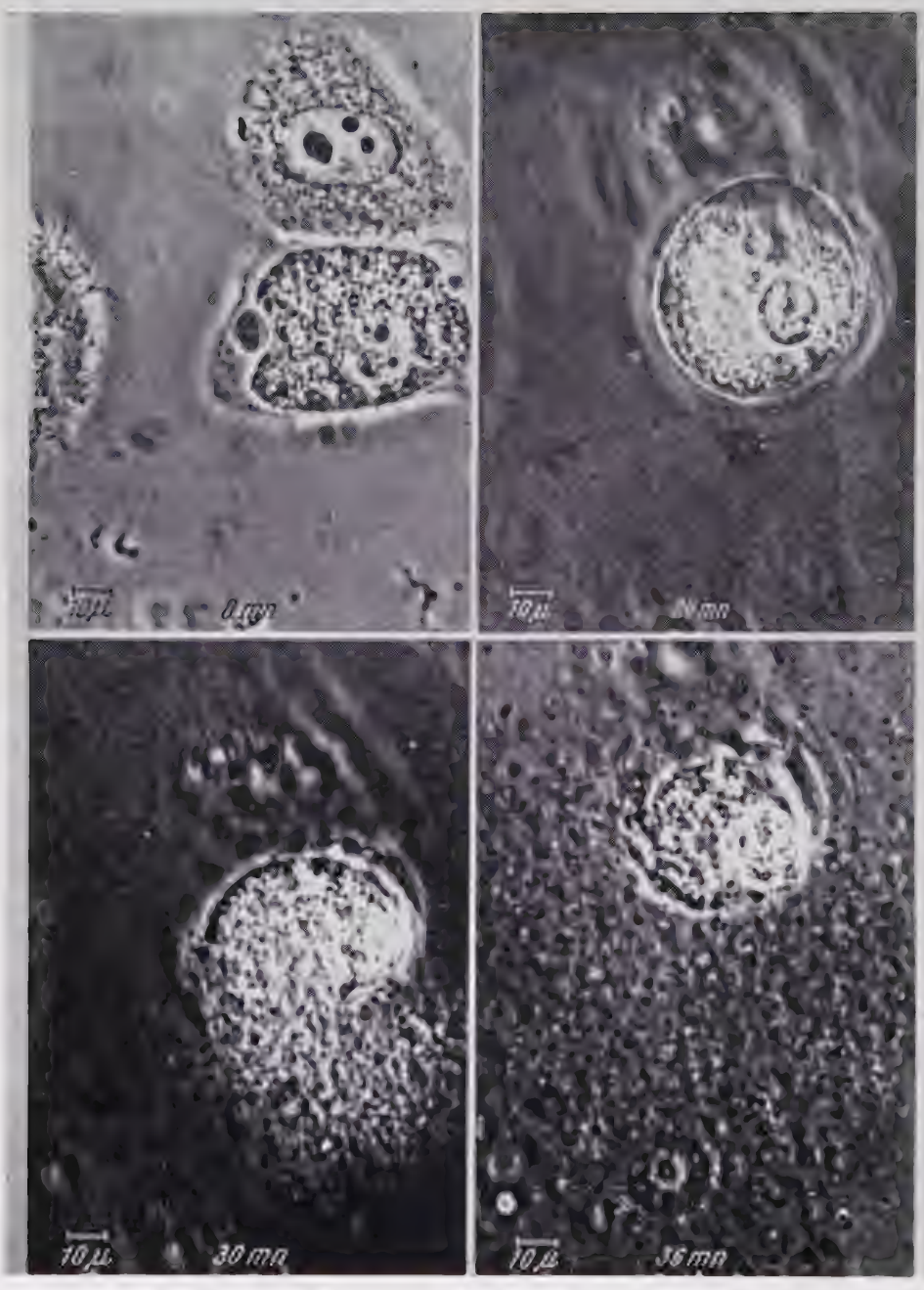


PLANCHE 33
Images de libération des particules.

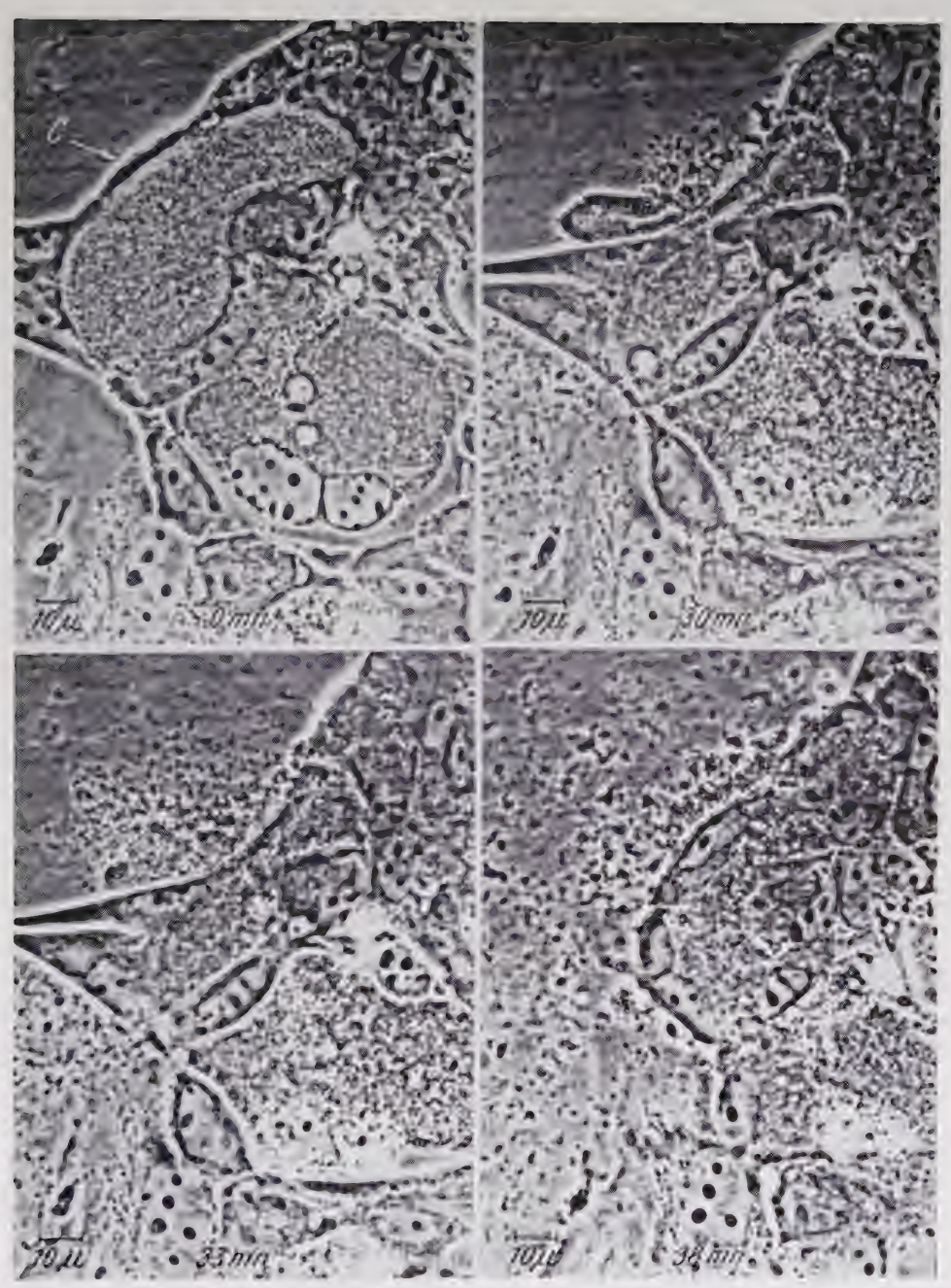


PLANCHE 34

Images de libération par rupture de la membrane cytoplasmique de la cellule-hôte.

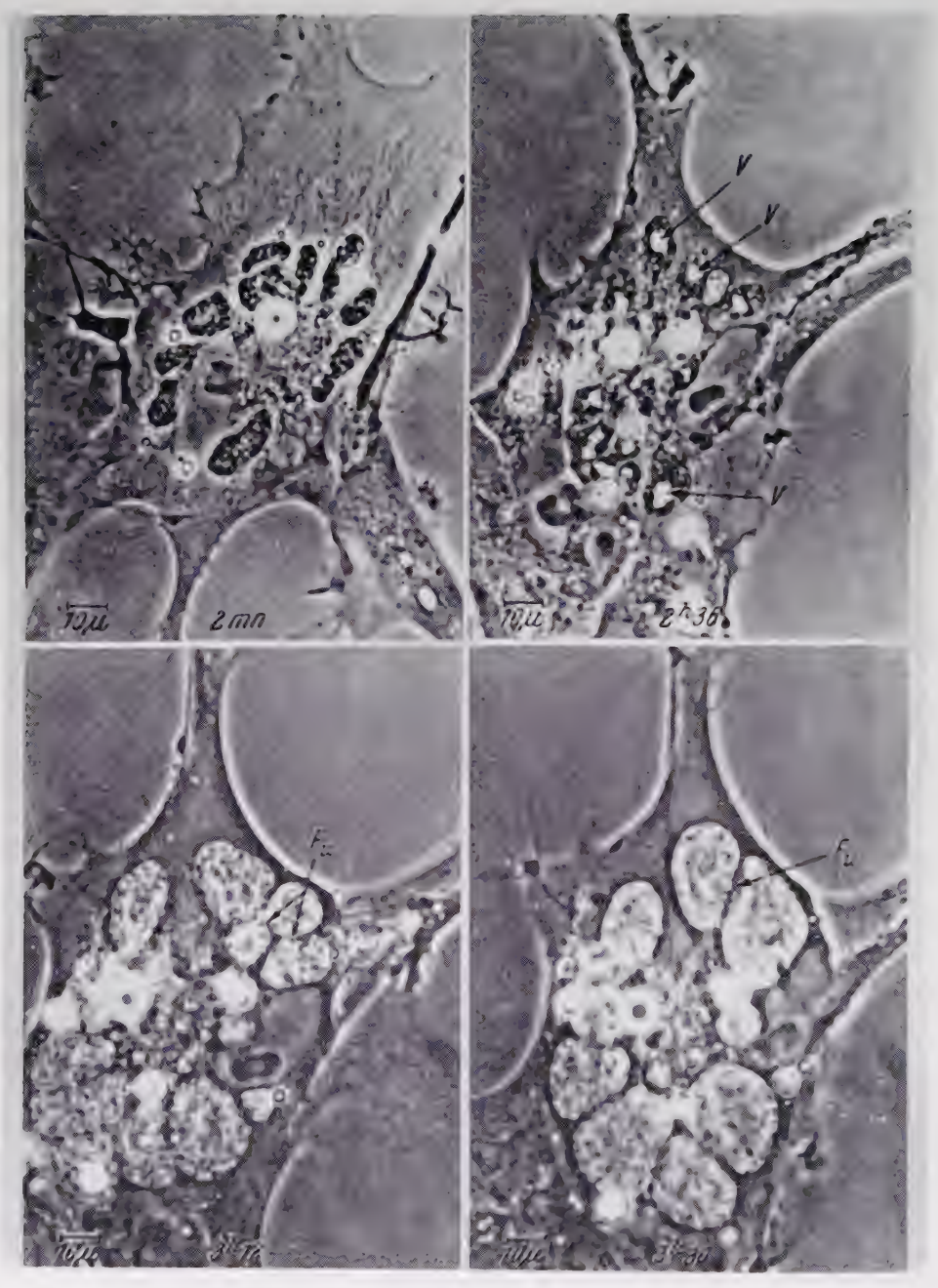


PLANCHE 35

La cellule présente plusieurs inclusions qui se vacuolisent et fusionnent.

à celle des corps initiaux. L'évolution de cette morula se fera vers la constitution d'une inclusion comme nous l'avons illustré dans la planche 31.

Grâce au système analyseur mentionné au chapitre « Matériel et Techniques », nous avons établi deux types de courbes de croissance : la première correspond à l'apparition de l'inclusion et aux tout premiers stades de son évolution. Pendant cette période, nous ne distinguons que quelques granulations homogènes proches les unes des autres, donnant ainsi à l'inclusion l'aspect d'une morula. L'autre stade, au-delà des six premières heures d'observation, permet d'étudier la croissance de l'inclusion et la transformation de son contenu.

Nous supposons, ce qui nous paraît vraisemblable dans les conditions de culture où nous sommes placés, que la croissance de l'inclusion se fait dans un plan ou plus exactement à épaisseur constante. En effet, l'espace où se développe la culture entre la lamelle de verre et la membrane de dialyse est quasi virtuel. Nous avons donc déterminé indirectement la surface des inclusions à partir de film 16 mm après relevés graphiques sur des agrandissements à rapport constant et planimétrie par pesée. Les valeurs obtenues sont donc exprimées en milligramme, les relations poids par temps et surface par temps étant donc identiques. Pour évaluer la précision de cette méthode, nous avons effectué plusieurs mesures pour une même inclusion. Les résultats en sont hautement significatifs.

a) *Inclusion primitive :* Morula

Nous avons, pour différentes séquences cinématographiques, établi les courbes de croissance des morula en fonction du temps. Le tableau 9 représente 6 de ces courbes pour six morula différentes. Le temps 0 marque le début de l'observation dont la durée est en moyenne de 5 heures. Les courbes présentées montrent bien que la relation surface par temps est constante, la croissance de la morula dans le temps est linéaire. Dans un des exemples où le comptage des particules a été possible, le rapport des surfaces de la morula au début et à la fin de l'enregistrement est à peu près égal à 5. Le nombre de particules dans la même morula est passée de 4 à 20, donc avec un rapport de croissance sensiblement le même (Tableau 10).

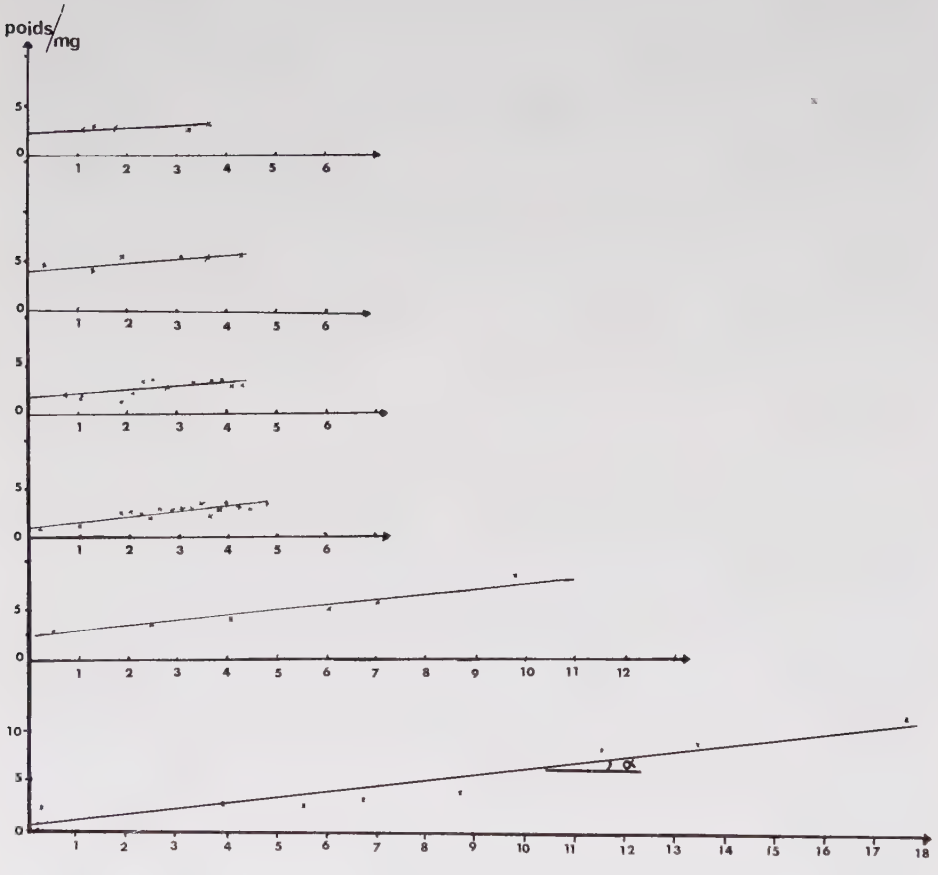
Les mensurations effectuées d'après les relevés graphiques montrent que la morula est constituée de particules de 0,7 à 1 μ de diamètre. Ce sont donc des corps initiaux, ceci est confirmé par les études en microscopie électronique effectuées sur d'autres cultures cellulaires, mais au même temps d'évolution. Nous voyons qu'à ce stade l'inclusion est toujours constituée de corps initiaux, dont certains très allongés présentent une constriction médiane signe d'une fission binaire.

b) *Inclusion proprement dite*

L'impression subjective recueillie à la projection des enregistrements est confirmée par les courbes de croissance des inclusions qui montrent (Tableau 11) :

TABLEAU 9

Courbes de croissance de 6 morula

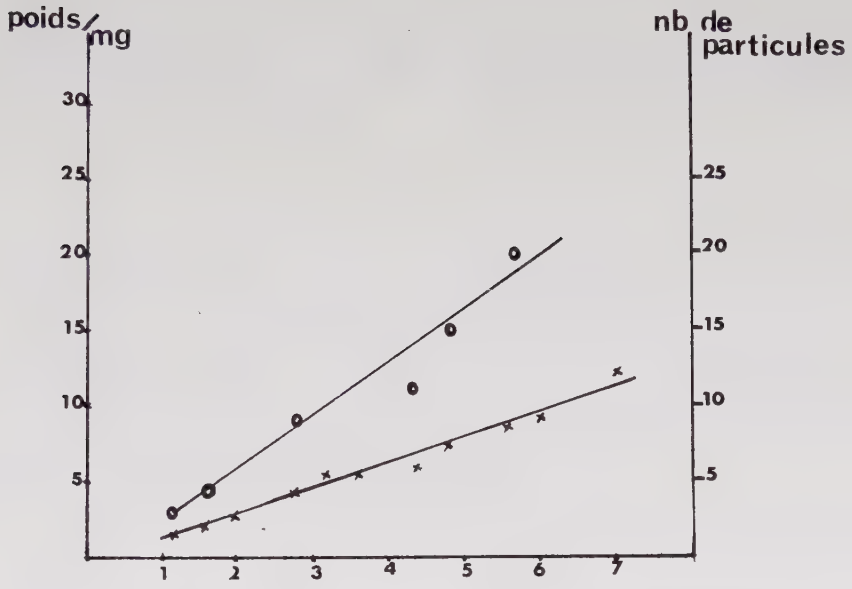


Durée de l'observation (heures)

L'observation a débuté à la quatrième heure de l'infection

TABLEAU 10

Etude quantitative de la croissance d'une morula



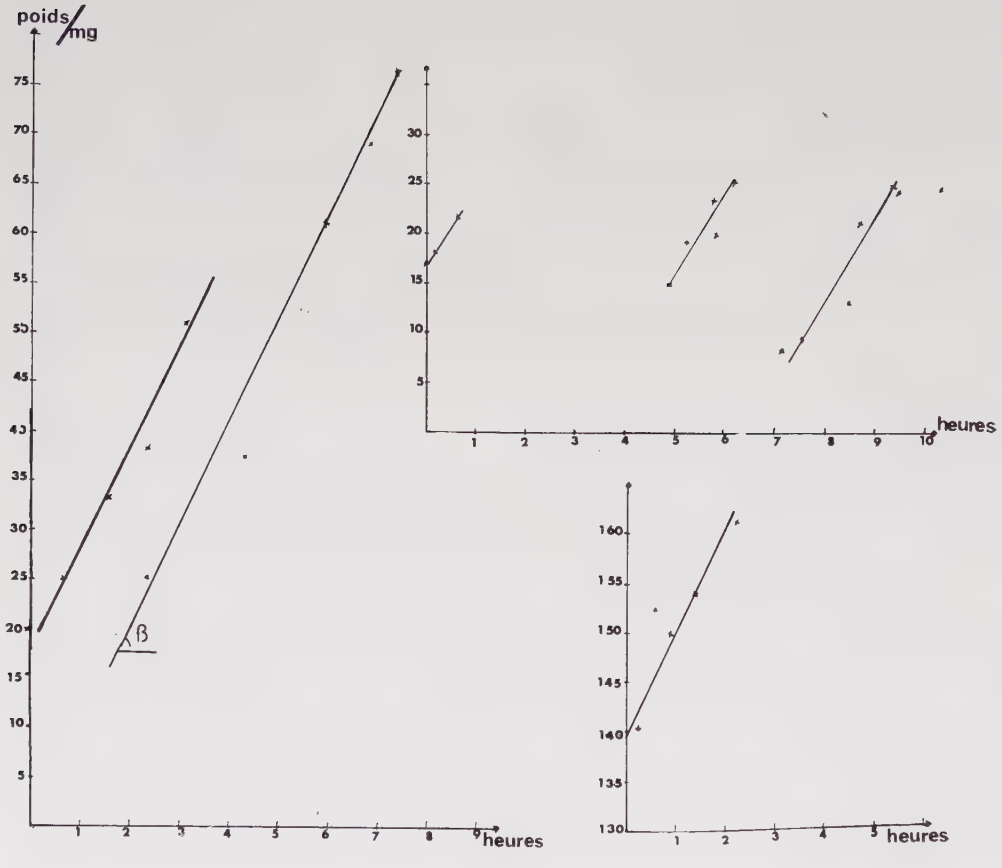
Durée de l'observation (heures)

L'observation a débuté à la quatrième heure de l'inrection

Temps de l'observation	Planimètrie exprimée en milligramme	Nombre de particules
1 h 12	7,05	4
2 h 48	1,8	9
4 h 24	4,2	11
4 h 28	6	15
5 h 36	8,8	20

TABLEAU 11

Courbes de croissance des inclusions



Durée de l'observation (heures)

L'observation a débuté à la vingt-deuxième heure de l'infection

— que cette croissance est elle aussi une fonction linéaire du temps ;

— que la pente de la droite est nettement plus élevée que celle obtenue pour la morula. C'est donc que la vitesse de croissance de l'inclusion parvenue à ce stade est plus grande.

La microscopie optique permet de distinguer clairement la présence de particules de plus petite taille de l'ordre de 0,4 μ, les corps élémentaires résultant de la fission du corps initial, puis de la transformation du corps intermédiaire après cette fission binaire.

3.2.4. **Discussion**

Nous avons, par la technique microcinématographique, suivi le développement intracellulaire de l'agent de l'ornithose. Notons cependant qu'il s'agit ici de résultats partiels concernant diverses séquences prises à des stades successifs du cyclé qui s'interpénètrent. Il existe, en effet, des difficultés techniques liées au repérage de la particule infectieuse et à l'observation prolongée de la cellule parasitée. Ceci implique une certaine marge d'imprécision quant aux interprétations quantitatives. Toutefois, l'apport de la microcinématographie a été essentiel pour préciser certaines données et saisir les différents aspects de l'inclusion au cours de son cycle d'évolution.

Les premières images que nous obtenons au début de l'infection concernent une morula de taille constante d'environ 2,5 à 4 μ qui apparaît brusquement. Dans certaines cellules, on a pu voir deux morula qui évoluent alors indépendamment l'une de l'autre sans altérer l'aspect de la cellule-hôte. Si ces deux morula sont très proches l'une de l'autre, elles fusionnent et constituent ainsi une formation de plus grande taille. Ce phénomène de fusion permet de comprendre qu'à ce stade précoce du cycle nous trouvions des formations de taille différente mais de structure identique dans les cellules d'une même culture.

Nous n'avons pu saisir le mécanisme exact de la formation des morula, c'est-à-dire le rassemblement des corps initiaux, tel que l'ont suggéré d'autres auteurs pour l'agent de la lymphogranulomatose vénérienne par exemple (4). Cependant, compte tenu de ce que nous savons sur la localisation des structures endocytées après leur pénétration dans la cellule, ce rassemblement devrait se faire dans la région de l'appareil de golgi, la planche 30 montre bien une telle migration à partir de la périphérie.

L'intérêt essentiel de la technique microcinématographique a été de permettre la comparaison des aspects dynamiques des inclusions à des stades différents. En outre, ces aspects dynamiques ont pu être comparés avec d'autres résultats obtenus en microscopie électronique. Au début de l'infection, au stade morula, les éléments qui constituent celle-ci sont immobiles, serrés les uns contre les autres et correspondent aux corps initiaux. Vers la trentième

heure de l'infection, les granules se mobilisent dans l'inclusion, c'est alors qu'apparaissent des particules de plus petite taille. Comme Podolyan (73), nous notons qu'elles sont agitées de mouvements. Ceci prouve qu'elles se trouvent dans une phase liquide, ce que confirment les images en microscopie interférentielle. Ce changement dans la dynamique de l'inclusion traduit-il la transformation du corps initial en corps intermédiaire, puis élémentaire ? Nous savons par les résultats de la microscopie électronique qu'à ce stade l'inclusion est occupée par une majorité de corps élémentaires sans figures de division. Il ne s'agit donc pas d'une croissance analogue à celle que nous avons décrite pour le stade morula, où les fissions binaires sont caractéristiques, mais d'une évolution des éléments-filles vers le corps élémentaire.

L'état de solation de la vacuole pourrait accompagner un phénomène de condensation des particules de l'inclusion. La comparaison des courbes de croissance montre qu'il y a deux stades dans l'évolution des inclusions, l'un à pente faible pendant les premières heures (Tableau 9), l'autre à pente forte pour le reste de l'évolution (Tableau 10). Cette différence de pente exprimerait un changement profond dans l'évolution de la population microbienne.

La microcinématographie nous a montré que l'évolution finale de l'inclusion pouvait s'effectuer suivant diverses modalités liées ou non à la mort de la cellule-hôte. Les corps élémentaires pourraient s'échapper de l'inclusion dans laquelle finalement seuls quelques corps initiaux persisteraient à la périphérie de la vacuole. Terskikh (94) a pu parler ainsi d'égrènement des corps élémentaires. Ceci serait en accord avec certaines images que nous obtenons en microscopie électronique dans du matériel infecté de 72 heures. La vacuole ne contient plus que quelques corps élémentaires. Cependant, les enregistrements microcinématographiques ne confirment pas cette hypothèse, car nous n'avons jamais vu de particules franchir la barrière de la membrane vacuolaire. D'ailleurs, les corps élémentaires recueillis dans le milieu de culture devraient, s'il en était ainsi, garder la trace de la traversée des deux membranes, celles de la vacuole et de la cellule. Or, il n'en est rien. Il est probable que la dispersion du contenu de la vacuole d'inclusion se fait, comme nous l'avons dit plus haut, par voie canaliculaire après fusion entre la membrane plasmatique et celle de la vacuole, mécanisme compatible avec la structure moléculaire de chacune d'elles.

IV

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Le cycle de développement intracellulaire des principaux membres des Chlamydiaceae a été décrit à l'intérieur de différentes cellules-hôtes tant épithéliales que fibroblastiques. Nous avons utilisé certaines de ces cellules et également les macrophages ; en effet, l'étude du développement de ces agents et, en particulier, celui de l'ornithose n'avait jamais été abordé dans ce type de cellules. Nous avons choisi les macrophages de la souris, compte tenu de la grande sensibilité de cet animal à cette maladie et en fonction des incidences des cellules du système reticulo-histiocytaire dans le déroulement des processus immunitaires.

In vitro, les macrophages péritonéaux de souris permettent, nous l'avons vu, la multiplication de l'agent de l'ornithose selon un cycle d'évolution identique à celui observé par d'autres auteurs avec d'autres agents du groupe. Les différentes caractéristiques générales de ce système : agent infectieux cellule-hôte peuvent être ainsi résumées à partir de nos propres observations.

En ce qui concerne la forme même de l'inclusion : dans les cellules HeLa, $BHK_{21}C_{13}$ et les fibroblastes d'embryon de poulet, elle se présente sous forme d'une masse granuleuse compacte entourant le noyau. Dans les macrophages, les groupements de particules y compris les corps élémentaires nouvellement formés, restent distincts les uns des autres. Leur fusion en une inclusion unique est assez rarement observée. Officier et Brown avaient déjà suggéré avec d'autres systèmes, que les modifications morphologiques de l'inclusion pourraient être influencées par certaines caractéristiques physiologiques de la cellule-hôte. Les particularités morphologiques que présente l'inclusion dans les macrophages sont en relation avec la variabilité fonctionnelle de ces cellules, en ce qui concerne, en particulier, son pouvoir de captation et ses activités enzymatiques, hydrolasiques très développées.

La deuxième différence importante est *l'action lytique* du germe au terme de sa multiplication ; les macrophages parasités sont très rapidement lysés vers la quarante-huitième heure de l'infection. Dans les autres type de cellules, les inclusions de l'agent de l'ornithose grandissent, envahissent le cytoplasme sans apparemment aucune altération cytologique. L'état fonctionnel des cellules ne semble pas perturbé puisqu'on peut y déceler de nombreuses mitoses. Ce fait avait été également signalé par Podolyan étudiant le développement de l'agent de l'ornithose dans des cellules épithéliales.

Notre étude ultrastructurale a permis de préciser la morphologie des différents types de particules et a apporté certaines données nouvelles concernant le cycle complexe du développement de l'agent de l'ornithose. Nous avons décrit la structure des corps initiaux, des corps intermédiaires et élémentaires, et plus particulièrement celle de leurs membranes. La cytochimie et la cytoenzymologie ont permis de montrer que ces trois types de particules possèdent deux « unit membrane » pour peu qu'on utilise une fixation convenable et que la dernière phase de maturation du germe, c'est-à-dire la formation du corps élémentaire, s'accompagne de la synthèse et de la mise en

place de polysaccharides dans le « cell wall ». L'évolution du corps initial vers le corps élémentaire est également marquée par des changements profonds des structures ADN et la différenciation d'un nucléoïde ; ce qu'avaient déjà signalé Litwin et coll. (51) pour l'agent de la psittacose.

Le corps initial contient un réseau fibrillaire de ADN et des grains R.N.P. en quantité. Nous pensons, avec d'autres auteurs cités dans le texte, que cette particule est, par ailleurs, adaptée aux échanges métaboliques : l'absence de « cell coat », l'aptitude de ces membranes à former des expansions vésiculaires impliquant une grande plasticité renforcent cette notion .C'est également à ce stade initial que nous avons noté la division par fission binaire de la particule. Dans la cellule macrophage, nous n'avons pas observé d'autres types de division, comme l'endosporulation décrite par Mitsui et coll. (58) pour l'agent du trachome. Toutefois en cellule HeLa, nous avons remarqué le long de la membrane externe du corps initial de petits éléments, suggérant la formation de « spores », mais sans autre preuve. Ces variations de comportement nous font souligner, une fois encore, le rôle important joué par la cellule-hôte. Un autre fait précis est en faveur de cette conception, comme nous l'avons signalé, on peut trouver du glycogène dans la vacuole d'inclusion indépendamment de ce que peuvent contenir les particules elles-mêmes. Dans la cellule macrophage, l'inclusion de l'agent de l'ornithose ne possède pas de glycogène. Ceci est en accord avec les conclusions de Gordon et Quan classant l'agent de l'ornithose dans le sous-groupe B des souches P.A.S. négatif. Avec certaines souches de l'agent de la Lymphogranulomatose, souche du sous groupe A, d'autres auteurs ont montré, à l'inverse, qu'aucune inclusion ne présentait de glycogène. Ces résultats très discordants permettent de penser que l'élaboration du glycogène ne constitue pas un facteur taxonomique évident pour le classement des différents membres du groupe P.L.T.

Ceci est important puisque certains auteurs ont proposé de classer ces agents selon le caractère positif ou négatif de la réaction P.A.S.

Par l'étude cinématographique, nous avons suivi le devenir de la morula — premier témoin de la présence du parasite — constituée uniquement de corps initiaux, jusqu'à l'inclusion et la libération des corps infectieux nouvellement formés. Nous n'avons pu, malgré les essais de repérage de la particule infectante, suivre les tout premiers stades de l'infection et saisir, en particulier, le phénomène de pénétration. Par contre, nous avons analysé les changements survenant dans l'inclusion au cours de son évolution : variation progressive de taille des éléments qui la constituent, mobilisation subite de la population microbienne vers la trentième heure de l'infection, impliquant de profonds changements dans le micro-environnement des particules.

Cette étude dynamique a permis de décrire les circonstances de la mort cellulaire dans l'infection ornithosique. Elle a permis d'appliquer également pour la première fois au matériel étudié une nouvelle méthodologie associant comportement vivant et ultrastructure, et d'établir les premières corrélations entre les différents temps du cycle de développement de l'agent de l'ornithose étudié jusqu'alors de façon fragmentaire par la seule microscopie électronique.

La grande sensibilité des cellules macrophages à l'agent de l'ornithose chez la souris représente un facteur de dissémination du germe in vivo. C'est la raison pour laquelle nous avons étudié ailleurs la maladie expérimentale de la souris (annexe n° 2) et abordé l'étude des mécanismes d'acquisition de l'immunité chez cet animal. Le rôle des facteurs humoraux ne semble pas important puisque la guérison survient sans production notable d'anticorps. Par contre, lorsque nous déprimons l'activité des cellules à fonction phagocytaire, par l'action de poussières comme l'ont montré d'autres auteurs chez le cobaye infecté par Mycobacterium kansasii (35), nous augmentons le pouvoir pathogène du germe chez la souris. Les cellules macrophages pourraient subir au niveau de leur appareil phagocytaire des modifications profondes entraînant une dépression des défenses cellulaires immunitaires. C'est dans ce sens que notre travail est actuellement poursuivi.

V

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. ANDERSON (D.R.), HOPPS (H.E.), BARILE (M.F.), BERNHEIM (B.C.). — Comparaison of the ultrastructure of several rickettsiae, ornithosis virus, and mycoplasma in tissue culture. J. of Bacteriol. **90,** 1387-1404, 1965.

2. ARCY GILL (S. d'), STEWART (R.B.). — Glucose requirements of L cells infected with Chlamydia psittaci. Canad. J. Microbiol. Canada. **16,** 997-1001, 1970.

3. ARCY GILL (S. d'), STEWART (R.B.). — Respiration of L cells infected with Chlamydia psittaci. Canad. J. Microbiol. Canada. **16,** 1033-1039, 1970.

4. ARMSTRONG (J.A.), REED (S.). — Nature and origin of initial bodies in lymphogranuloma venereum. Nature **201,** 4917, 371-373, 1964.

5. ARMSTRONG (J.A.), VALENTINE (R.C.), FILDES (C.). — Structure and replication of the trachoma agent in cell cultures, as shown by electron microscopy. J. Gen. Microbiol. **30,** 59-73, 1963.

6. BADER (J.P.), MORGAN (H.R.). — Latent viral infection of cells in tissue culture. VI. Role of amino acids, glutamine, and glucose in psittacosis virus propagation in L cells. J. Exptl. Med. **108,** 617-630, 1958.

7. BANK (J.), EDDIE (B.), SCHACHTER (J.), MEYER (K.F.). — Plaque formation by Chlamydia in L. cells. Infection and Immunity **1,** 259-262, 1970.

8. BARRON (A.L.), ZAKAY-RONES (Z.), BERNKOPF (H.). — Hemagglutination of chicken erythrocytes by the agent of psittacosis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **119,** 377-381, 1965.

9. BARWELL (C.F.). — Some observations on the antigenic structure of psittacosis and lymphogranuloma venereum viruses. I. Preparation and use in complement fixation tests of antisera from different sources. Brit. J. Exptl. Path. **33,** 258-267, 1952.

10. BEDSON (S.P.). — Observations bearing on the antigenic composition of psittacosis virus. J. Exptl. Pathol. **17,** 109-121, 1936.

11. BEDSON (S.P.). — Observations on the developmental forms of psittacosis virus. Brit. J. Exptl. Pathol. **14,** 267-277, 1933.

12. BEDSON (S.P.), BLAND (J.O.W.). — The developmental forms of psittacosis virus. Brit. J. Exptl. Pathol. **15,** 243-247, 1934.

13. BEDSON (S.P.), WESTNER (G.T.). — Observation on the virus of psittacosis. Brit. J. Exptl. Pathol. **11,** 502-511, 1930.

14. BENEDICT (A.), O'BRIEN (E.). — Antigenic studies on the psittacosis group of viruses. II. Characterization of complement fixation antigens extrated with sodium laurylsulfate. J. Bacteriol. **76,** 293-300, 1956.

15. BERNHARD (W.). — Une méthode de coloration régressive à l'usage de la microscopie électronique. C.R. Acad. Sc. Paris **267,** Série D, 2170-2173, 1968.

16. BERNKOPF (H.). — A plaque test for TRIC agents. Am. J. Ophthal. **63,** 1206-1207, 1967.

17. BERNKOPF (H.), MASHIAH (P.). — The growth cycle of a trachoma agent in FL cell cultures. J. Immunol. **88,** 570-571, 1962.

18. BERNKOPF (H.), MASHIAH (P.), BECKER (Y.). — Correlation between morphological and biochemical changes and the appearance of infectivity in FL cell cultures infected with trachoma agent. Ann. N.Y. Acad. Sci. **98,** 62-81, 1962.

19. BERNKOPF (H.), NISHMI (M.), MAYTHAR (B.), FEITELBERG (I.). — Darkfield agglutination of fluorocarbontreated virus by serums of trachoma patients and immunized rabbits. J. Inf. Dis. **106,** 83-86, 1960.

20. BROWN (A.), ITATANI (M.), MOULDER (J.). — The effect of trypsin and other enzymes on feline pneumonitis virus. J. Inf. Dis. **91,** 184-190, 1952.

21. CHANG (Y.T.). — Long term cultivation of mouse peritoneal macrophages. J. Nat. Cancer, Inst. **32,** 1-19, 1964.

22. CHRISTOFFERSEN (G.), MANIRE (G.P.). — The toxicity of meningopneumonitis organisms (Chlamydia psittaci) at different stages of development. J. Immunol. **103**, 1085-1088, 1969.

23. COLES (A.C.). — Psittacosis in domestic pigeons. Onderstepoort J. Vet Sci. Animal Ind. **15,** 141-148, 1940.

24. COLLIER (L.H.), DUKE-ELDER (S.), JONES (B.R.). — Experimental trachoma produced by cultured virus. Brit. J. Ophthal. **XLII,** 12, 705-720, 1958.

25. COLÓN (J.I.), MOULDER (J.W.). — Folic acid in purified preparations of members of the psittacosis group of micro-organisms. J. Inf. Dis. **103,** 109-119, 1958.

26. CROCKER (T.T.), EASTWOOD (J.M.). — Subcellular cultivation of a virus growth of ornithosis virus in nonnucleate cytoplasm. Virology **19,** 23-31, 1962.

27. CROCKER (T.T.), PELC (S.R.), NIELSEN (B.I.), EASTWOOD (J.M.), BANKS (J.). — Population dynamics and deoxyribonucleic acid synthesis in HeLa cells infected with an ornithosis agent. J. Inf. Dis. **115,** 105-122, 1964.

28. ERLANDSON (R.A.), ALLEN (E.G.). — The ultrastructure of meningo-pneumonitis. Virology **22,** 410-418, 1964.

29. FAN (V.S.), JENKIN (H.M.). — Glycogen metabolism in Chlamydia infected HeLa cells. J. of Bacteriol. **104,** 608-609, 1970.

30. FAUVE (M.R.). — Résistance cellulaire à l'infection. Revue Fr. Etudes clin. Biol. **9,** 100-104, 1964.

31. FREDERIC (J.), CHEVREMONT (M.). — Recherches sur les chondriosomes de cellules vivantes par la microscopie et la microcinématographie en contraste de phase (première partie). Extraits des Archives de Biologie, **LXIII,** Fasc. 1, 1952.

32. FURNESS (G.), GRAHAM (D.M.), REEVE (P.). — The titration of trachoma and inclusion Blennorrhoea viruses in cell cultures. J. Gen. Microbiol. **23,** 613-619, 1960.

33. GAUGLER (R.W.), NEPTUNE (E.M.), ADAMS (G.M.), SALLEE (T.L.), WEISS (E.), WILSON (N.N.). — Lipid synthesis by isolated Chlamydia psittaci. J. Bacteriol. **100,** 823-826, 1969.

34. GAYLORD (W.H.). — Intracellular forms of meningo-pneumonitis virus. J. of Exptl. Med. **100,** 575-580, 1954.

35. GERNEZ-RIEUX (Ch.), TACQUET (A.), MOUQUE (V.). — Etude du pouvoir pathogène pour l'animal des Mycobactéries atypiques. Influence du virus grippal et du quartz sur l'infection expérimentale. Ann. Inst. Pasteur Lille **10,** 9-20, 1958-1959.

36. GOGOLAK (F.M.), ROSS (M.R.). — The properties and chemical nature of psittacosis virus hemagglutinin. Virology **1,** 474-496, 1955.

37. GORDON (F.B.), QUAN (A.L.). — Occurrence of glycogen in inclusions of the Psittacosis—lymphogranuloma venereum—trachoma agents. J. Inf. Dis. **115,** 186-196, 1965.

38. GRAHAM (D.M.). — Growth and immunogenicity of TRIC agents in mice. Am. J. Ophthal. **63,** 5, 1173-1190, 1967.

39. HAAGEN (E.), MAUER (G.). — Ueber eine auf den Menschen Ubertragbare Viruskranheit bei Sturmvögeln und ihre Beziehung zur Psittakose. Zentr. Baketeriol. Parasitenk. Abt. I **143,** 81-88, 1938.

40. HEINMETS (F.), GOLUB (O.J.). — Observations on the growth of psittacosis virus in chorioallantoic membranes by electron microscope. J. Bacteriol. **56,** 509-525, 1948.

41. HIGASHI (N.). — Electron microscopic studies on the mode of reproduction of trachoma virus and psittacosis virus in cell cultures. Explt. Mol. Pathol. **4,** 24-39, 1965.

42. HOSAKA (Y.), NISHI (Y.). — Structure of meningo-pneumonitis virus particles. Biken's J. **5,** 21-28, 1962.

43. JADIN (J.M.), CREEMERS (J.), JADIN (J.). — Contribution à l'étude de l'ultrastructure de l'agent rickettsien de l'ornithose observé dans les cellules de l'épithélium pulmonaire de souris infectée expérimentalement. Bull. de la Soc. Path. Exotique **62,** 303-311, 1969.

44. JENKIN (H.M.). — Preparation and properties of cell walls of the agent of meningo-pneumonitis. J. Bacteriol. **80,** 639-647, 1960.

45. KUWATA (T.), SHIBA (S.). — Influence of glucose on the multiplication of ornithosis virus in vitro. Experientia **11,** 269-272, 1955.

46. LEDUC (E.H.), BERNHARD (W.). — Recent modifications of the glycol methacrylate embedding procedure. J. Ultrastruct. Res. **19,** 196-199, 1967.

47. LEVADITI (J.C.), ROGER (F.), DESTOMBES (P.). — Tentative de classification des Chlamydiaceae (Rake 1955) tenant compte de leurs affinités tissulaires et de leur épidémiologie. Ann. Inst. Pasteur **107,** 656-662, 1964.

48. LEVINTHAL (W.). — Recent observations on psittacosis. The Lancet, 1207-1210, 1935.

49. LILLIE (R.D.). — Psittacosis rickettsia-like inclusions in man and in experimental animals. Publ. Hlth. Rep. Wash. **45,** 773-778, 1930.

50. LITWIN (J.). — Growth cycle of trachoma in the embryonated egg. Ann. N.Y. Acad. Sci. **98,** 145-162, 1962.

51. LITWIN (J.), OFFICIER (J.E.), BROWN (A.), MOULDER (J.). — A comparative study of the growth cycles of different members of the psittacosis group in different host cells. J. Inf. Dis. **109,** 251-279, 1961.

52. MANIRE (G.P.). — Structure of purified cell wall of dense forms of meningo-pneumonitis organisms. J. of Bacteriol. **91,** 409-413, 1966.

53. MANIRE (G.P.), TAMURA (A.). — Preparation and chemical composition of the cell walls of mature infectious dense forms of meningo-pneumonitis organisms. J. of Bacteriol. **94,** 1178-1183, 1967.

54. MATSUMOTO (A.), MANIRE (G.P.). — Electron microscopic observations on the fine structure of cell walls of Chlamydia psittaci. J. of Bacteriol. **104,** 1332-1337, 1970.

55. MEYER (K.F.). — Psittacosis. AUK **57,** 330-332, 1940.

56. MEYER (K.F.), EDDIE (B.). — Latent psittacosis infections in mice. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **30,** 483-484, 1933.

57. MEYER (K.F.), EDDIE (B.), YANAMURA (H.Y.). — Ornithosis (psittacosis) in pigeons and its relation to human pneumonitis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **49,** 609-615, 1942.

58. MITSUI (Y.), FUJIMOTO (M.), KAJIMA (M.). — Development and morphology of trachoma agent in the yolk sac cell as revealed by electron microscopy. Virology **23,** 30-45, 1964.

59. MITSUI (Y.), KAJIMA (M.), NISHIMURA (A.), KONISHI (K.). — Morphology of trachoma agent in conjunctiva and chick embryo. Ann. N.Y. Acad. Sci. **98,** 131-144, 1962.

60. MONCEL (C.). — Méthode simple et rapide de contrôler un temps de pose et la qualité d'une image en microcinématographie. Sond aus Research Film **6,** 165-167, 1967.

61. MOULDER (J.W.). — The psittacosis group as bacteria. John Wiley and Sons, Inc New York, 1964.

62. MOULDER (J.W.), GRISSO (D.L.), BRUBAKER (R.R.). — Enzymes of glucose catabolism in a member of the psittacosis group. J. of Bacteriol. **89,** 810-812, 1965.

63. MOULDER (J.W.), WEISS (E.). — Purification and properties of the agent of feline pneumonitis. J. Inf. Dis. **88,** 56-67, 1951.

64. MYERS (R.M.), CAREY (D.E.), REUBEN (R.), ARNSTEIN (P.), GEORGE (S.). — Isolation of a bedsonial agent in Vellore, South India, from the blood of grey herons. Am. J. Trop. Med. Hyg. **18,** 58-60, 1969.

65. OFFICER (J.E.), BROWN (A.). — Growth of psittacosis virus in tissue culture. J. Inf. Dis. **107,** 283-299, 1960.

66. ORMSBEE (R.A.), WEISS (E.). — Trachoma agent: glucose utilisation by purified suspensions. Science **142,** 1077-1078, 1963.

67. OSSOWSKI (L.), BECKER (Y.), BERNKOPF (H.). — Amino acid requirements of trachoma strains and other agents of the P.L.T. group in cell culture. Israel J. Med. Sci. **1,** 186-193, 1965.

68. PADAWER (J.). — The nomarski interference-contrast microscope. An experimental basis for image interpretation. J. of Royal Micros. Soc. **88,** 305-349, 1968.

69. PAGE (L.A.). — Proposal for the recognition of two species in the genres chlamydiae Jones, Rakes and Stearns. Intern. J. Systematic Bact. **18,** 51-66, 1968.

70. PARIKH (G.C.), SHECHMEISTER (I.L.). — Agglutination of white blood cells by meningo-pneumonitis organisms. J. Path. and Bact. **93,** 317-328, 1967.

71. PERKINS (H.R.), ALLISON (A.C.). — Cell wall constituents of rickettsiae and psittacosis-lymphogranuloma organisms. J. Gen. Microbiol. **30,** 469-480, 1963.

72. PIRAINO (F_2), ABEL (C.). — Plaque assay for psittacosis virus in monolayers of chick embryo fibroblasts. J. of Bacteriol. **87,** 1503-1511, 1964.

73. PODOLYAN (V.Y.), MILYUTIN (V.N.), GUDIMA (O.S.), LUKINA (R.N.). Morphogenesis of ornithosis virus. Vop. Virusol. **9,** 2, 208-212, 1964.

74. POLLARD (M.), TANAMI (Y.). — Cytochemistry of trachoma virus replication in tissue cultures. Ann. N.Y. Acad. Sci. **98,** 50-61, 1962.

75. RAMBOURG (A.). — Détection des glycoprotéines en microscopie électronique ; coloration de la surface cellulaire et de l'appareil de Golgi par un mélange acide chromique-phosphotungstique. C.R. Acad. Sci. (Paris) **265,** 1426-1428, 1967.

76. RICE (C.E.). — The carbohydrate matrix of the epithelial cell inclusion in trachoma. Am. J. Opht. **19,** 1-8, 1938.

77. RIERA (M.C.), BARRON (A.L.). — Reactions with hemagglutinin of psittacosis agent in Gel diffusion. Proc. Exp. Biol. Med. **135,** 594-597, 1970.

78. REED (L.J.), MUENCH (H.). — A simple method for estimating LD_{50} endpoints. Am. J. Hygiene **27,** 493-497, 1938.

79. REEVE (P.). — Trachoma viruses isolated in United States. VII. Relative toxicity of different strains for white mice. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **116,** 373-375, 1964.

80. ROBINEAUX (R.), MONCEL (C.). — Installation 16 mm pour l'analyse image par image d'enregistrements microcinématographiques. Sond. aus Research Film **6,** 5, 472-476, 1969.

81. ROSE (G.G.), POMERAT (C.M.), SHINDLER (T.O.), TRUNNELL (J.B.). — A cellophane-strip technique for culturing tissue in multipurpose culture chambers. J. Biophy. Biochem. Cytol. **4,** 6, 761-764, 1958.

82. RYTER (A.), KELLENBERGER (E.). — Etude au microscope électronique de plasmas contenant de l'acide désoxyribonucléique. I. Les nucléoïdes des bactéries en croissance active. Z. Naturforsch. **13 b,** 597-605, 1958.

83. SAROV (I.), BECKER (Y.). — Trachoma agent DNA. J. Mol. Biol. **42,** 581-589, 1969.

84. SAROV (I)., BECKER (Y.). — RNA in the elementary bodies of trachoma agent. Nature **217,** 849-852, 1968.

85. SAROV (I.), BECKER (Y.), BERNKOPF (H.). — Studies on the nucleic acids of the trachoma agent. Israel J. Med. Sci. **2,** 661, 1966.

86. SMADEL (J.E.). — Atypical pneumonia and psittacosis. J. Clin. Invest. 22-57, 1943.

87. SYKES (J.A.), MOORE (E.B.). — A simple tissue culture chamber. Tex. Rep. Biol. Med. **18,** 288-297, 1960.

88. TAJIMA (M.), NOMURA (Y.), KUBOTA (Y.). — Structure and development of viruses of the psittacosis-lymphogranuloma group observed in the electron microscope. J. of Bacteriol. **74,** 605-620, 1957.

89. TAMURA (A.). — Isolation of ribosome particles from meningo-pneumonitis organisms. J. of Bacteriol. **93,** 6, 2009-2016, 1967.

90. TAMURA (A), HIGASHI (N.). — Purification and chemical composition of meningo-pneumonitis virus. Virology **20,** 596-604, 1963.

91. TAMURA (A.), MATSUMOTO (A.), HIGASHI (N.). — Purification and chemical composition of reticulate bodies of the meningo-pneumonitis organisms. J. of Bacteriol. **93,** 6, 2003-2008, 1967.

92. TANAMI (Y.), POLLARD (M.), STARR (T.J.). — Replication pattern of psittacosis virus in a tissue culture system. Virology **15,** 22-29, 1961.

93. TAVERNE (J.), BLYTH (W.A.), REEVE (P.). — Toxicity of the agents of trachoma and inclusion conjunctivitis. J. Gen. Microbiol. **37,** 271-275, 1964.

94. TERSKIKH (I.I.), ZAIROV (K.). — A comparative study of trachoma and ornithosis viruses. Vop. Virusol. **9,** 674-677, 1964.

95. THIERY (J.P.). — Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. J. Microscop. **6,** 987-1018, 1967.

96. TREUHAFT (M.W.), MOULDER (J.W.). — Biosynthesis of arginine in L cells with Chlamydiae. J. of Bacteriol. **96,** 2004-2011, 1968.

97. TRIBBY (I.E.). — Cell wall synthesis by chlamydia psittaci growing in L cells. J. of Bacteriol. **104,** 1176-1187, 1970.

98. WAGNER (J.C.), GOLUB (O.J.), ANDREW (V.W.). — Purification of psittacosis virus by alcohol precipitation and centrifugation. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **69,** 202-206, 1948.

99. WEISS (E.). — Comparative metabolism of Chlamydia with special reference to catabolic activities. Am. J. Ophthal. **63,** 1098-1101, 1967.

100. WEISS (E.), HUANG (J.S.). — The infected cell count method of titration of feline pneumonitis virus. J. Inf. Dis. **97,** 107-125, 1954.

101. WEISS (E.), WILSON (N.N.). — Role of exogenous adenosinetriphosphate in catabolic and synthetic activities of Chlamydia psittaci. J. of Bacteriol. **97,** 719-724, 1969.

102. YANAMURA (H.Y.), MEYER (K.F.). — Active immunity to the microbacterium multiforme psittacosis in the mouse. J. Immunol. **44,** 195-209, 1942.

103. YOTSUYANAGI (M.Y.). — Mise en évidence au microscope électronique des chromosomes de la levure par une coloration spécifique. C.R. Acad. Sci. **250,** 1522-1524, 1960.

104. ZAKAY-RONES (Z.), KATZENELSON (E.), LEVY (R.). — Hemagglutinin of trachoma agent. Israel J. Med. Sci. **4,** 305-306, 1968.

VI

ANNEXE

PLANCHE 1
Particules de l'agent de l'ornithose après purification par l'Arcton (G × 30.000).

PLANCHE 2
La chambre de Sykes-Moore.

PLANCHE 3
Les différents éléments de la chambre de Sykes-Moore.
Les deux lamelles de verre reposent entre le tore de silicone.

PLANCHE 4
La chambre de Rose montée.

PLANCHE 5
Les différents éléments de la chambre de Rose. La membrane de dialyse repose sur le joint de caoutchouc « pluribar ».

PLANCHE 6
Installation de microcinématographie.

PLANCHE 7
Installation pour l'analyse des films.

PLANCHE 8
Macrophage témoin après 78 heures de culture.
Noter le développement du Golgi et du système lysosomal (G × 50.000).

PLANCHE 9
Macrophage 6 heures après l'infection : corps intermédiaires inclus dans une vacuole.

PLANCHE 10
Macrophage 24 heures après l'infection. Formation d'une inclusion constituée uniquement de corps initiaux (G × 18.000).

PLANCHE 11
Formation de la vacuole d'inclusion : 24e heure.
Anastomose des vacuoles de phagocytose de chaque corps initial (G × 30.000).

PLANCHE 12
Inclusion à 72 heures d'infection montrant une seule vacuole remplie d'agents infectieux à différents stades de développement (G × 10.000).

PLANCHE 13
Inclusion à 72 heures d'infection dans un macrophage (G × 10.000).

PLANCHE 14
Particules de l'agent de l'ornithose après fixation glutaraldéhyde-acide osmique. *Fig. 1.* — Corps initial. *Fig. 2-3.* — Corps intermédiaires à deux stades différents d'évolution. *Fig. 4.* — Corps élémentaire. Noter que la membrane interne n'est pas visible.

PLANCHE 15
Formation de petites vésicules à partir de la membrane externe du corps initial (G × 300.000).

PLANCHE 16
Fission : images de fission binaire à trois stades d'évolution (G × 50.000).

PLANCHE 17
« Morula » dans une cellule HeLa.
Noter les amas de glycogène dans le cytoplasme (G × 30.000).

PLANCHE 18
Inclusion dans une cellule HeLa - 72 heures d'infection (G × 10.000).

PLANCHE 19

Inclusion dans une cellule HeLa à la 72e heure d'infection.
Noter le glycogène à l'intérieur de l'inclusion (G × 10.000).

PLANCHE 20

Particules de l'agent de l'ornithose après fixation de Ryter et Kellenberger.
Noter les membranes bien visibles du corps élémentaire (G × 150.000).

PLANCHE 21

Fig. 1. — Réaction de Séligman et Thiéry après 35 minutes d'incubation à la thiosemicarbazine. La réaction est négative au niveau des membranes.
Fig. 2-3. — Réaction de Séligman et Thiéry après action de l'alpha amylase. La digestion des grosses particules n'est que partielle.
(G × 150.000).

PLANCHE 22

Réaction de Thiéry après 24 heures d'incubation avec la thiosemicarbazine.
Noter la positivité de la membrane interne du corps élémentaire (G × 30.000).

PLANCHE 23

Témoin pour l'action de la RNAse (G × 30.000).

PLANCHE 24

Action de la RNAse, 30 mn. - Digestion de la zone granuleuse (G × 30.000).

PLANCHE 25

Action conjuguée de la pepsine et de la RNAse, 30 mn. Disparition de la zone granuleuse du corps élémentaire (G × 30.000).

PLANCHE 26

Action de la DNAse 4 heures sur macrophage, à la 72e heure d'infection.
Digestion partielle du nucléoïde (G × 10.000).

PLANCHE 27

Action de la DNAse 4 heures. - Fort grossissement (G × 90.000).

PLANCHE 28

Témoin pour la coloration régressive (G × 30.000).

PLANCHE 29

Disparition du DNA du nucléoïde par la coloration régressive (G × 30.000).

PLANCHE 30

Début de l'infection : apparition de la morula qui migre de la périphérie à la région périgolgienne.

PLANCHE 31

Premiers stades observables de la morula dans une cellule déjà parasitée.

PLANCHE 32

Fig. 1. — Inclusion à la 21e heure d'infection.
Noter les lysosomes venant au contact de l'inclusion.
Fig. 2-3. — Inclusion à la 29e et 37e heure d'infection.
Noter les différences de taille entre les particules de la morula et de l'inclusion à un même temps d'observation, entre les particules de deux inclusions à des stades différents.

PLANCHE 33

Images de libération des particules.

PLANCHE 34

Images de libération par rupture de la membrane cytoplasmique de la cellule-hôte.

PLANCHE 35

La cellule présente plusieurs inclusions qui se vacuolisent et fusionnent.

Imprimé avec le périodique « *Annales de l'Institut Pasteur* ».
(N° d'ordre 4301. — Extrait Juillet 1967. — Tome 113, pp. 19-27.)

ÉTUDE DU CYCLE DE DÉVELOPPEMENT DE L'AGENT DE L'ORNITHOSE DANS LES MACROPHAGES DE SOURIS (*)

par J. ORFILA et A. LEPINAY
(avec la collaboration technique de Mme ASTESANO)

(Faculté de Médecine d'Amiens et Centre d'Immunopathologie et de Cytopathologie Expérimentales, Service de Physio-Pathologie Cellulaire, I.N.S.E.R.M., Hôpital Saint-Antoine, Paris.)

La réceptivité des cellules macrophagiques à différents micro-organismes, tant bactéries (*Mycobacterium tuberculosis* [9], *Salmonella enteritides, Listeria monocytogenes* [5]) que virus a fait l'objet de nombreux et récents travaux contribuant à une meilleure connaissance des relations hôte-parasite.

Il nous a paru intéressant d'étudier en culture de macrophages le devenir d'un agent du groupe psittacose-lymphogranulomatose vénérienne, groupe dont la place taxonomique est encore mal définie. Nous avons choisi pour cette étude une souche d'ornithose et une culture de macrophages péritonéaux de souris.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Technique d'obtention et de culture des macrophages. — Nous avons adopté une technique voisine de celle qu'a préconisée Chang [3] et que Fauve [4] a bien mise au point (1).

Les macrophages sont obtenus par lavage de la cavité péritonéale de souris mâles de 25 à 30 g. Deux souches de souris ont été utilisées : IC et DBA2, provenant du Centre de Recherches sur le Cancer de Villejuif. Signalons que ces deux souches de souris sont sensibles à l'agent de l'ornithose inoculé par voie intrapéritonéale.

Deux milieux sont utilisés :

1° *Le milieu de prélèvement* est constitué par du milieu semi-synthétique 199 Parker (Institut Pasteur, Paris), auquel sont ajoutés

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 2 mars 1967.

(1) Nous remercions bien vivement le Dr Fauve qui a accepté de nous initier à cette technique au Laboratoire de Physio-Pathologie Expérimentale de Garches.

10 p. 100 de sérum de veau sans antibiotique (Institut Pasteur, Lille) 5 U. d'héparine sans antiseptique, 50 µg de streptomycine ; le pH est ajusté à 6,8.

2° *Le milieu d'entretien* est constitué par du milieu semi-synthétique 199 Parker, additionné de 5 p. 100 de sérum de veau, le pH est ajusté à 6,8.

Les souris sont tuées par écrasement cervical et attachées sur le dos, la peau abdominale est incisée suivant la ligne médiane, et rabattue sur le thorax. On introduit alors stérilement et vigoureusement dans la cavité péritonéale 5 cm³ de milieu de prélèvement à l'aide d'une seringue avec aiguille à biseau court (12/10). On recueille successivement et stérilement le liquide de lavage des cavités péritonéales des différentes souris. Le mélange est placé dans une fiole à + 4°. On utilise une suspension cellulaire renfermant 5 à 7.10⁵ cellules par millilitre, qui est répartie dans différents tubes de Leighton, à raison de 2 ml par tube. Les tubes sont saturés à l'aide d'un mélange de gaz carbonique et d'air (CO_2 5 p. 100, air 95 p. 100). Après deux jours d'étuve à 37°, le milieu de prélèvement est remplacé par le milieu d'entretien.

Selon la souche de souris utilisée, l'examen des lamelles après trois jours de culture montre des résultats différents. Avec la souche IC la population cellulaire est homogène comprenant 90 à 95 p. 100 de grandes cellules mononucléées, présentant les caractères des macrophages. Il faut noter que les rares lymphocytes présents n'adhèrent pas au verre et sont rapidement éliminés au cours des changements de milieu. Avec les souris DBA2 les pourcentages cellulaires sont différents : 65 p. 100 de macrophages, 30 p. 100 de lymphocytes, 5 p. 100 de mastocytes.

Souche d'ornithose. — Elle nous a été fournie par le Dr Dekking de l'Institut d'Hygiène d'Amsterdam, et a été conservée au laboratoire par passages successifs sur œuf de poule embryonné. Pour l'inoculation des macrophages nous avons utilisé un sac vitellin fortement infecté, broyé dans 5 cm³ de liquide de Hanks. Le broyat est centrifugé à 1 000 t/min., ce qui donne trois couches différentes. La couche intermédiaire, riche en corps élémentaires et pauvre en lipides et en fragments cellulaires constitue l'inoculum non dilué. Les dilutions sont faites dans le milieu d'entretien ; elles sont titrées sur cellules HeLa en couche monocellulaire. Le taux d'infectiosité est donné par le pourcentage de cellules infectées pour 100 cellules en culture.

Technique d'inoculation des macrophages. — Cette technique est simple : les lamelles retirées des tubes de Leighton, recouvertes de macrophages bien adhérents, sont posées sur supports de verre en boîte de Petri stériles. Elles sont recouvertes par un volume donné de l'inoculum. Après un temps de contact de trente minutes à 37° l'excès d'inoculum est retiré et la lamelle, remise en tube de Leighton, est recouverte de 2 ml de milieu d'entretien.

A des temps variables après l'inoculation, les lamelles sont retirées,

rincées soigneusement dans une solution de chlorure de sodium à 8,5 p. 100, fixées à l'alcool méthylique pendant dix minutes et colorées au May-Grünwald-Giemsa.

Technique d'obtention des immunsérums. — Des souris de la même origine que les lots utilisés pour l'obtention des macrophages ont reçu par voie intrapéritonéale une suspension de l'agent de l'ornithose, cinq fois successivement à des intervalles de vingt et un jours. Une semaine après la dernière injection les souris sont saignées par voie rétro-orbitaire. On effectue sur chaque sérum recueilli une réaction de fixation du complément avec l'antigène ornithosique. Les sérums dont le titre atteint ou dépasse 1/160 sont conservés.

RÉSULTATS

I. — Description du cycle de développement.

Nous présenterons tout d'abord les résultats obtenus sur macrophages en culture depuis quarante-huit heures et provenant de la souche IC.

A la 7e heure aucune différence significative n'apparaît entre les macrophages infectés et les macrophages témoins. Nous ne mettons pas en évidence de particules infectées en utilisant le microscope optique.

A la 12e heure on note dans le cytoplasme de certaines cellules infectées la présence de formations arrondies groupées soit par deux, soit par quatre (tétrades), situées généralement dans une région proche de la concavité du noyau. Elles sont colorées en bleu par le Giemsa. C'est selon la terminologie de Bedson, le stade des corps initiaux.

A la 28e heure les corps initiaux deviennent plus nombreux et augmentent de taille. Ils affectent la forme de petite « morula », évoquant l'agrégation de plusieurs corps arrondis. Ils présentent la même affinité tinctoriale que précédemment (pl. I, fig. 1).

A la 24e heure une inclusion est formée. Les corps initiaux toujours présents sont mêlés à de nombreuses granulations plus petites colorées en violet par le Giemsa. Il s'agit des corps élémentaires. L'ensemble est noyé dans une masse homogène qui donne à l'inclusion un contour flou et rend difficile l'identification des constituants. Certaines cellules renferment plusieurs amas qui restent distincts les uns des autres et ne forment pas une seule et grande inclusion (pl. I, fig. 2). A ce moment, alors que se forment les corps élémentaires, la mortalité des cellules-hôtes est très importante. Les macrophages parasités s'arrondissent, éclatent, laissant sur la lamelle des

fragments de cytoplasme bourrés de particules élémentaires et des noyaux pycnotiques (pl. I, fig. 3).

A la 48e heure l'apparition d'un deuxième cycle suggère que le développement à l'intérieur du macrophage de souris de l'agent de l'ornithose ne modifie pas son pouvoir infectieux. Ce point nous paraît d'autant plus important à préciser que les macrophages vecteurs de parasites peuvent jouer un rôle très important dans la pathogénie d'une maladie infectieuse. Nous avons donc utilisé le surnageant de tubes de culture prélevé à la 24e heure pour inoculer d'autres cultures de macrophages normaux. Les inclusions typiques se sont développées, montrant que l'agent avait conservé son pouvoir infectieux.

A la 72e heure la mort de toutes les cellules d'une même culture s'échelonne ; parfois cependant quelques macrophages plus résistants restent en bon état. La mort cellulaire est donc bien sous la dépendance de l'agent de l'ornithose.

II. — Influence de différents facteurs.

a) Rôle de la souche de souris donneuse. — Aucune différence n'a été notée, que les macrophages proviennent de souris IC ou de souris DBA2. Il nous semble cependant préférable d'utiliser les souris IC car elles fournissent des populations cellulaires plus homogènes.

b) Rôle de la dose. — Des macrophages de quarante-huit heures sont parasités par trois dilutions différentes :

α) Lors de l'ensemencement massif nous constatons un polyparasitisme intense de toutes les cellules de la culture, avec une lyse marquée dès la 22e heure.

β) Avec la suspension diluée à 1/100 l'évolution du germe par cellule est beaucoup plus lente : le corps initial n'apparaît qu'à la 16e heure après l'inoculation. Quelques cellules seulement par culture sont parasitées. Toutefois les différentes étapes de développement du germe : pénétration, transformation en corps initiaux, puis en corps élémentaires sont similaires et se succèdent de façon identique.

γ) Avec la dilution au 1/1 000 il n'y a pas de cellules infectées.

c) Influence de l'âge des macrophages en culture. — A la *24e heure* de culture, les macrophages présentent des granulations nombreuses de taille variable, d'identification difficile lors de leur observation dans des chambres à perfusion au microscope à contraste de phase. Cependant, les colorations au May-Grünwald-Giemsa permettent de suivre le développement du germe. Aucune

différence n'a été notée entre le cycle évoluant dans des macrophages de quarante-huit heures et le cycle évoluant dans des macrophages de vingt-quatre heures.

d) Action de la pénicilline. — On sait, depuis les travaux de Weiss [**10**] que les agents ornithose-psittacose sont sensibles à la pénicilline et qu'il apparaît sous son influence des formes anormales. Nous avons donc suivi le même schéma expérimental que précédemment en ajoutant une série de tubes T, renfermant 200 U. de pénicilline par millilitre de milieu d'entretien.

A la 12e heure, alors que les macrophages sans pénicilline présentent déjà des corps initiaux, rien n'apparaît dans les cellules avec pénicilline.

A la 22e heure, les corps initiaux sont présents, mais leur morphologie est différente de celle des témoins. Les corps élémentaires sont de grosses boules colorées en violet par le Giemsa. Leur taille est de l'ordre de plusieurs millimicrons (pl. II, fig. 6).

A la 24e heure il n'y a pas d'inclusion typique. Les corps initiaux sont toujours présents. Ils sont séparés les uns des autres sans qu'il se produise de rassemblement de particules. Cette image nous a paru très caractéristique de l'action de la pénicilline qui semble empêcher, d'une part, la transformation des corps initiaux en corps élémentaires, d'autre part la formation d'une inclusion par rassemblement des différents corps initiaux.

A la 72e heure la différence entre les macrophages sans pénicilline et avec pénicilline est encore plus marquée que précédemment, puisque aucune inclusion typique n'apparaît en présence de l'antibiotique : le cytoplasme du macrophage est porteur de grosses boules qui n'ont pas fusionné et ne se sont pas divisées (pl. II, fig. 5, 6, 7, 8).

e) Action des immunsérums. — La mise en évidence de la capacité des macrophages à phagocyter les agents de l'ornithose posait immédiatement le problème de leur opsonisation. Le schéma expérimental est simple : la suspension microbienne est répartie en trois lots de 0,5 ml. On ajoute alors au premier 0,5 ml de sérum de souris immunes, au deuxième 0,5 ml de sérum de souris normales, au troisième, 0,5 ml de sérum physiologique. Chaque suspension est mise à l'étuve à 37° pendant trente minutes et agitée soigneusement. Par ailleurs les macrophages cultivés sur lamelles en tubes de Leighton sont répartis en trois séries. Les tubes de chaque série reçoivent 0,02 ml des différentes suspensions et sont remis à l'étuve pendant vingt-quatre, trente ou quarante-huit heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules parasitées et résumés dans le tableau I.

Tableau I.

Heures	Inoculum		
	Agent infectieux + immunsérum	Agent infectieux + sérum normal	Agent infectieux + sérum physiologique
24 h	373	182	91
30 h	356	133	36
48 h	313	76	5

Nous voyons donc que l'immunsérum augmente la capacité de phagocytose que possèdent les macrophages en présence de sérum normal de souris. Mais le macrophage de souris normale, comme le démontrent nos premières expériences, ne possède pas l'équipement enzymatique permettant à la cellule phagocytaire de détruire le microbe au sein de son cytoplasme. Bien au contraire, l'agent de l'ornithose y effectue tout son cycle de développement et la destruction macrophagique libère alors les particules élémentaires virulentes.

III. — Résultats obtenus chez différentes cellules-hôtes.

Afin de comparer le mode de développement dans différentes lignées cellulaires nous avons réalisé le même type d'expérience que précédemment en ajoutant aux tubes de macrophages des tubes d'autres souches cellulaires : fibroblastes de poulet, cellules embryonnaires de lapin (ERK), cellules HeLa. Nous assistons au déroulement du même cycle de développement : l'inclusion, formée d'abord de quelques corps initiaux, grandit et présente un mélange de corps initiaux et de corps élémentaires. Cependant l'aspect de l'inclusion diffère : dans les cellules HeLa, ERK, dans les fibroblastes de poulet elle se présente sous forme d'une masse granuleuse compacte dessinant un croissant bien séparé du cytoplasme de la cellule-hôte (pl. I, fig. 4). Dans le macrophage, les groupes de corps élémentaires restent distincts les uns des autres et fusionnent rarement en une

PLANCHE I.

Inclusions intracytoplasmiques de l'agent de l'ornithose.

Fig. 1, 2 et 3. — Dans les macrophages : à la 18e heure (fig. 1) ; à la 24e heure (fig. 2) ; à la 48e heure (fig. 3).

Fig. 4. — Dans les cellules HeLa à la 48e heure.

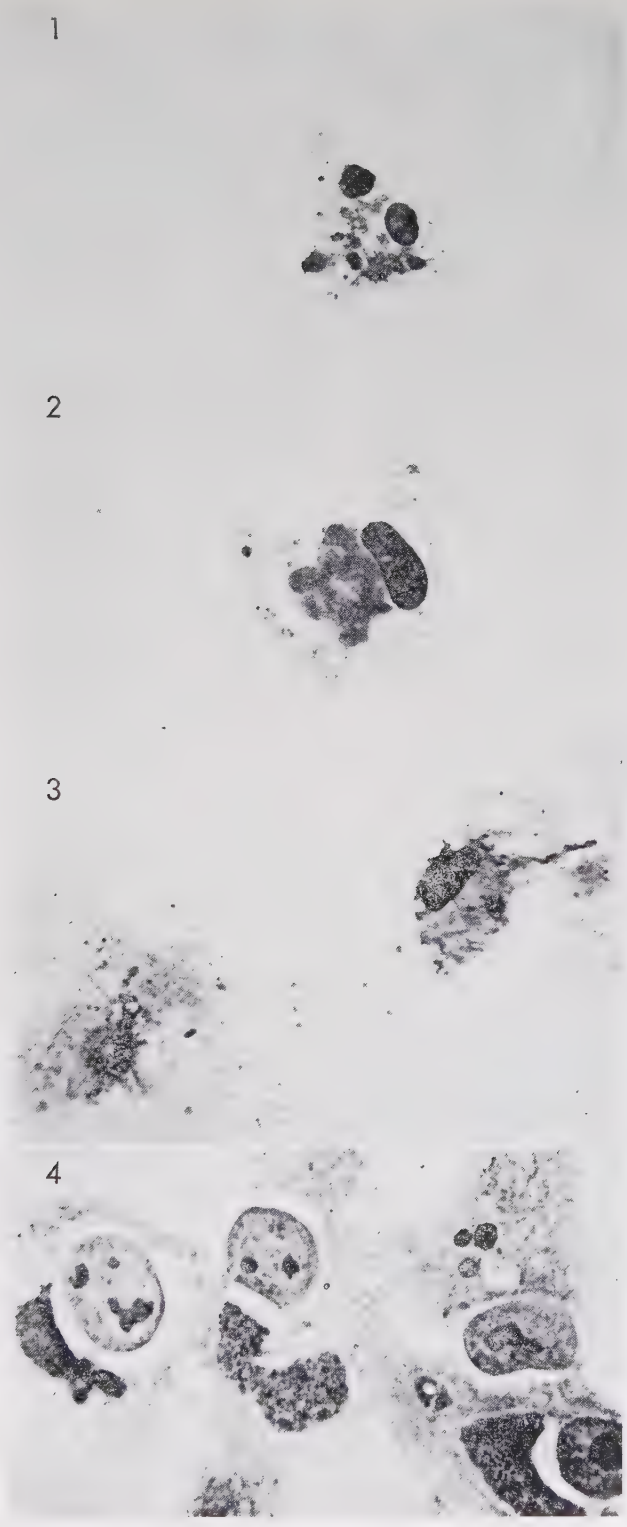


PLANCHE I.

PLANCHE II

Comparaison de l'évolution de l'agent de l'ornithose dans les macrophages.

Fig. 5. — 12e heure du cycle : tétrade de corps initiaux.

En présence de pénicilline :

Fig. 6. — Corps initiaux à formes géantes, dispersés.

Fig. 7. — 24e heure : lyse du macrophage et éparpillement des particules.

Fig. 8. — 24e heure, pas de multiplication-blocage du stade des corps initiaux.

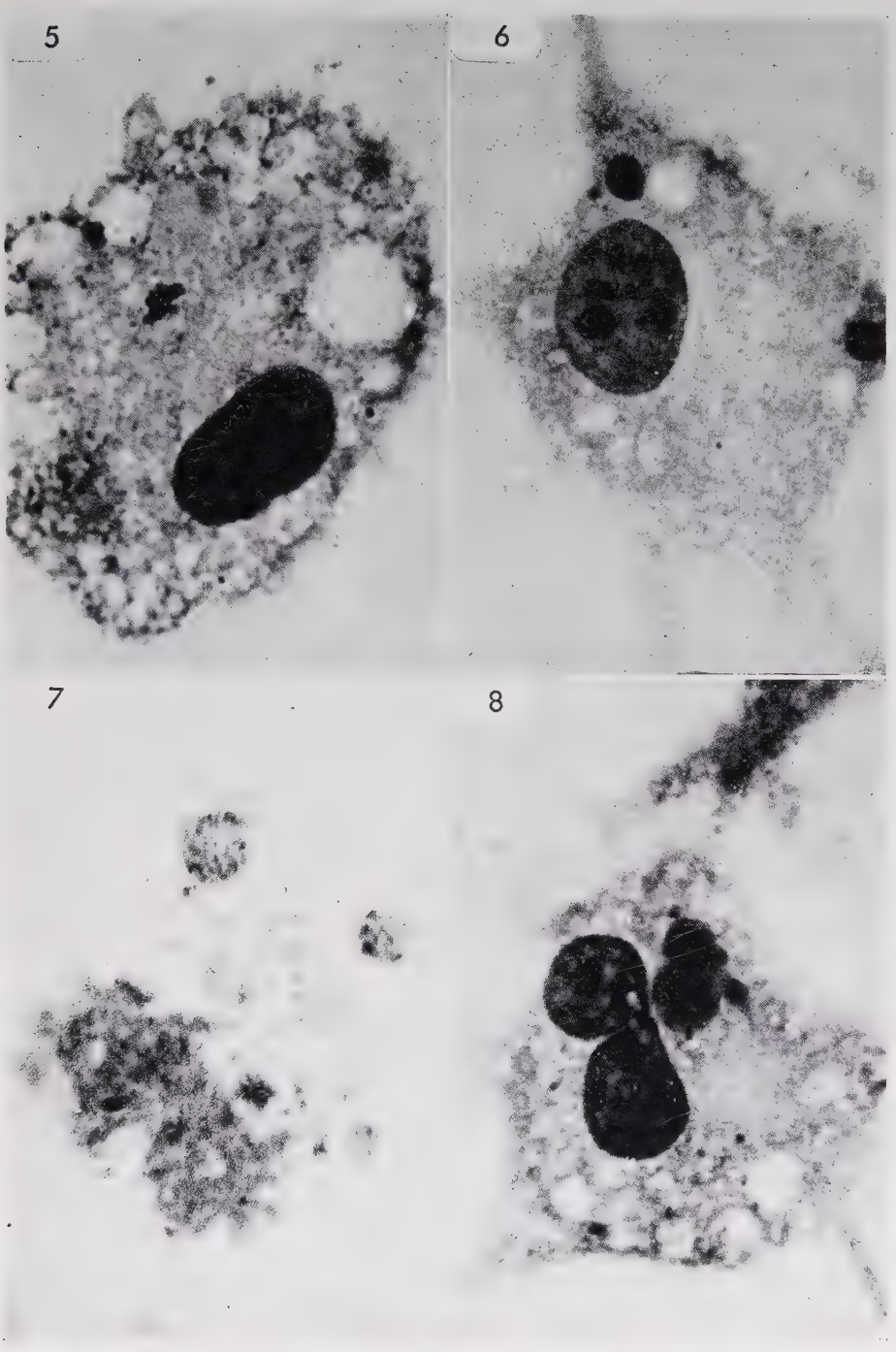


Planche II.

inclusion unique. Alors que dans les autres souches cellulaires il est très facile de séparer optiquement les différents constituants, dans les macrophages, l'ensemble des éléments microbiens semble noyé dans une masse amorphe.

La deuxième différence essentielle est l'action lytique du germe au terme de sa multiplication. Cet effet n'est jamais mis en évidence avec les autres souches cellulaires. Alors que les macrophages infectés éclatent et sont brutalement détruits à la 48e heure, dans les autres cellules les inclusions grandissent lentement et au quatrième jour de l'infection il est impossible de mettre en évidence une altération cytologique.

La phagocytose du jaune d'œuf décelable par la coloration rosâtre de masses anhistes ne participe pas à cette action destructrice : les macrophages témoins ayant reçu une suspension de sac jaune non infecté ne meurent pas ; c'est donc bien le germe qui est responsable de l'effet cytotoxique. Il est important de noter que sont détruits, non seulement les macrophages présentant une inclusion, mais aussi les macrophages non parasités. Cela nous permet de suggérer l'existence d'une toxine à l'origine de cet effet.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les travaux de nombreux auteurs avaient démontré la facilité avec laquelle l'agent de l'ornithose-psittacose se développe à l'intérieur des cellules en culture. Cependant la réceptivité des macrophages n'avait encore jamais été étudiée. La multiplication microbienne est importante et entraîne une lyse marquée des cellules, ce qui ne se produit pas lorsque d'autres souches cellulaires en lignée continue sont utilisées. Nous ne savons pas expliquer la mort cellulaire qui survient chez le macrophage parasité. Il pourrait s'agir de l'action d'une toxine déjà décrite chez les agents du groupe ; les macrophages y seraient particulièrement sensibles. Il reste à expliquer la nature de cette sensibilité. Signalons que Pearson et coll. [7] ont obtenu une lyse de cellules diploïdes infectées par l'agent de la psittacose (souche 6 BC).

L'étude morphologique du cycle de développement met en évidence les formes décrites précédemment : corps initiaux et corps élémentaires. Une différence apparaît dans la forme des inclusions qui, homogènes dans la cellule de type épithélial, sont souvent fragmentées, polymorphes dans le macrophage. Brown [2] a déjà suggéré que les modifications morphologiques de l'inclusion dans une cellule peuvent être influencées par l'état fonctionnel ou physiologique de la cellule. L'aspect fragmenté de l'inclusion est peut-être en relation avec l'équilibre morphodynamique très particulier du cytoplasme du macrophage.

Le macrophage devenant ainsi vecteur d'un parasite qui conserve sa virulence peut être un des éléments importants de la dissémination du microbe dans l'organisme de la souris. Mims [6] a bien montré tout l'intérêt d'un tel mécanisme lors de l'hépatite de la souris due à l'ectromélie. L'immunsérum augmente le pouvoir de phagocytose des macrophages normaux, mais l'opsonine ainsi mise en évidence n'empêche pas *in vitro* la multiplication intracellulaire du germe. Ce résultat pose le problème du rôle de cet anticorps dans l'immunité acquise. La comparaison entre la réceptivité du macrophage cultivé avec sérum immun ou non et sans sérum est, on l'a vu, très instructive.

Elle permet de dégager :

1° L'augmentation du parasitisme en présence de sérum immun.

2° L'augmentation du parasitisme en présence de sérum normal par rapport au milieu sans sérum.

Morgan a déjà signalé ce dernier point et pensé que le sérum était indispensable pour assurer la multiplication dans la cellule-hôte. Il nous semble qu'on pourrait expliquer ce phénomène par une simple action favorisante du sérum (immun ou non), sur la phagocytose. On sait, en effet pour les bactéries, que celle-ci est la plus importante en présence d'immunsérum, moindre en présence de sérum normal et la plus faible en milieu dit physiologique [8].

La pénicilline n'empêche pas la pénétration du microbe à l'intérieur du macrophage, mais entraîne le développement de formes géantes qui demeurent séparées dans le cytoplasme du macrophage sans que l'on voie apparaître l'inclusion typique caractérisant les agents de ce groupe. La microscopie optique ne permet pas d'étudier le mécanisme de l'action de l'antibiotique : il semble que seuls persistent des corps initiaux.

RÉSUMÉ

Des macrophages prélevés dans la cavité péritonéale de souris et cultivés *in vitro* sont sensibles à l'agent de l'ornithose.

L'influence de différents facteurs sur la réceptivité de ces cellules est étudiée. Il n'existe pas de variations importantes entre le cycle de développement de ce germe dans de telles cellules et le cycle précédemment décrit dans d'autres cellules réceptives.

La sensibilité des macrophages permet de mettre en évidence l'existence d'opsonines dans le sérum des souris immunes et d'entrevoir l'importance du rôle de ces cellules dans la maladie et l'immunité chez la souris.

SUMMARY

THE USE OF MACROPHAGE CULTURES IN THE STUDY OF THE ORNITHOSIS AGENT DEVELOPMENT.

Mouse peritoneal macrophages, cultivated *in vitro,* are sensitive to the ornithosis agent. A study was made in order to determine the influence of various factors on the receptivity of the above cell type.

No significant difference was observed in the evolution cycle of this germ as far as macrophages were compared to other receptive cells.

Macrophages seem to be particularity suitable for the detection of opsonine in immune mouse serum. It is suggested that macrophages play a significant part in the pathogenesis of ornithosis and in the immune response to the infectious agent.

BIBLIOGRAPHIE

[1] BENNETT (B.). *Amer. J. Pathology,* 1966, **48**, 165-181.
[2] BROWN (A.). *Ann. N. Y. Acad. Sci.,* 1962, **98**, 122-130.
[3] CHANG (Y. T.). *J. nat. Cancer Inst.,* 1964, **32**, 1-19.
[4] FAUVE (M. R.). *Revue Fr. Etudes clin. biol.,* 1964, **9**, 100-104.
[5] MAKANESS (G. B.). *J. exp. Med.,* 1962, **126**, 389-406.
[6] MIMS (C. A.). *Bact. Rev.,* 1964, **28**, 30-70.
[7] PEARSON (W.), DUFF (J. T.), GEARINGER (N. F.) and ROBBINS (M. L.). *J. inf. Dis.,* 1965, **115**, 49-58.
[8] ROBINEAUX (R.). *Semaine Hôp., Path. Biol. Arch. Biol. méd.,* 5 sept. 1956.
[9] SUTER (E.). *J. exp. Med.,* 1953, **97**, 235-244.
[10] WEISS (E.). *J. inf. Dis.,* 1950, **87**, 249-263.

Imprimé avec le périodique « *Annales de l'Institut Pasteur* ».
(N° d'ordre 4417. — Extrait Janvier 1969. — Tome 116, pp. 111-120.)

ÉTUDE DE L'ORNITHOSE EXPÉRIMENTALE DE LA SOURIS BLANCHE INFECTÉE PAR VOIE INTRAPÉRITONÉALE

par J. ORFILA et A. LEPINAY (*)
[avec la collaboration technique de Cl. SPINA]

(Faculté de Médecine d'Amiens et Centre d'Immunopathologie et de Cytopathologie Expérimentales, Service de Physio-Pathologie Cellulaire, I.N.S.E.R.M., Hôpital Saint-Antoine, Paris)

L'ensemble des travaux expérimentaux concernant le rôle de l'immunité dans le groupe psittacose-trachome-conjonctivite à inclusions a été réalisé essentiellement avec l'agent de la psittacose. Krumwiede [5], le premier, a montré la réceptivité de la souris blanche : cette maladie fut ensuite étudiée par Bedson [1] et Hornus [4]. Meyer [6] souligna la présence d'une infection latente chez la souris inoculée par voie intrapéritonéale. Burnet [2] compara l'évolution de la maladie chez différentes espèces animales.

L'agent de l'ornithose, apparenté par sa structure antigénique à celui de la psittacose, a un pouvoir pathogène différent. Il est caractérisé par une virulence beaucoup moins marquée pour la souris blanche ; ce fait nous a paru intéressant pour une analyse des mécanismes de l'immunité. Aussi nous sommes-nous attachés à l'étude de l'infection expérimentale de la souris blanche inoculée par voie intrapéritonéale avec l'agent de l'ornithose.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souche de l'agent infectieux

Une souche d'ornithose nous a été fournie par le Dr Dekking de l'Institut d'Hygiène de l'Université d'Amsterdam. La suspension infectieuse provient du broyage dans un appareil Virtis de 5 sacs vitellins d'œufs inoculés et recueillis à la mort de l'embryon. Une légère centrifugation à 1 000 t/mn élimine la couche lipidique de l'homogénat. Les dilutions sont effectuées à l'aide d'une solution de Hanks et sont titrées sur cellules HeLa en couche monocellulaire, en comptant le nombre d'inclusions décelées dans 100 cellules selon une technique proposée

(*) Manuscrit reçu le 3 avril 1968.

par Furness, Graham et Reeve [3]. L'observation est faite à la vingt-quatrième heure après l'inoculation. Nous avons utilisé comme inoculum de base 0,5 ml d'une suspension microbienne déterminant pour une dose non diluée, 33 inclusions pour 100 cellules.

Voie d'inoculation

Des études précédentes nous ayant montré la réceptivité des macrophages péritonéaux de souris vis-à-vis de l'agent de l'ornithose [7], nous avons injecté les animaux par voie intrapéritonéale. Les animaux témoins reçoivent 0,5 ml d'une suspension de sac vitellin d'œuf normal homogénéisé selon le même procédé. Les réinoculations ont toujours été faites par la même voie.

Etudes sérologique et cytologique

1° *Prélèvements.* — Le sang est prélevé par ponction du plexus rétro-orbitaire, à l'aide d'une pipette effilée et soigneusement recourbée. On peut ainsi recueillir 0,3 ml environ de sang par animal, ce qui permet de répéter les prélèvements au cours de l'expérience et d'étudier l'évolution des anticorps chez un même animal. Le liquide péritonéal est examiné synchroniquement et prélevé de la façon suivante : après désinfection à l'alcool iodé de la peau, une pipette Pasteur, bien effilée, est introduite par légères poussées à travers la paroi abdominale ; le liquide est aspiré facilement. Des frottis, colorés par la méthode de May-Grünwald Giemsa, permettent la recherche de l'agent de l'ornithose.

2° *Technique de mise en évidence des anticorps.* — Nous avons étudié les anticorps déviant le complément en utilisant le microtitrateur de Takatsy [9].

Les sérums sont décomplémentés à 56° pendant trente minutes, puis répartis dans les micro-alvéoles des plaques de plexiglass. L'appareil de Takatsy permet d'effectuer les micro-dilutions des sérums grâce à l'utilisation ingénieuse de micro-anses spiralées, à long manche qui, plongées dans l'alvéole, prélèvent un volume de 0,025 ml de liquide. L'antigène utilisé est l'antigène de groupe psittacose lymphogranulomatose fourni par l'Institut Pasteur. L'emploi de cette microtechnique permet une économie de matériel biologique particulièrement intéressante dans les cas où l'on utilise de petits animaux. Elle permet aussi l'étude simultanée de 8 sérums différents (pl. I, fig. 1).

RÉSULTATS

I. Etude clinique de la maladie due a une primo-inoculation

a) Description. — L'étude a porté sur 187 souris recevant des dilutions différentes de l'inoculum de base. Toutes ont présenté des symptômes évidents : après une courte phase d'incubation silencieuse, les animaux sont moins vifs ; ils ont une diarrhée importante ; certains meurent rapidement dans un état de cachexie au

cours des premiers jours qui suivent l'inoculation. Chez ceux qui survivent plus longtemps se développe une ascite qui atteint le plus souvent des proportions considérables. Il est quelquefois possible de retirer 10 cm³ de liquide lors des ponctions péritonéales. La mort peut survenir à ce moment-là. Quelquefois, au contraire, l'ascite régresse et l'animal guérit.

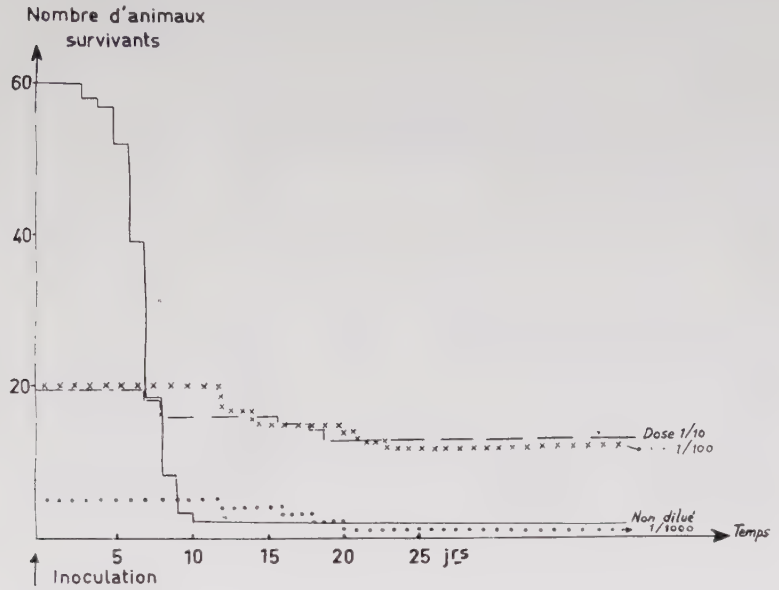


FIG. 1.

b) EVOLUTION EN FONCTION DE LA DOSE INOCULÉE. — La mortalité et la durée de la maladie sont fonction de la dose. La figure 1, donnant l'évolution de la mortalité en fonction de la dose injectée, illustre bien le fait que lorsqu'on utilise un inoculum non dilué (33 inclusions pour 100 cellules) la mort survient dans les dix premiers jours, et la mortalité est de 70 p. 100 des animaux.

L'amaigrissement est considérable et très rapide. Il n'est pas rare qu'un animal perde 20 à 40 p. 100 de son poids dans les dix premiers jours suivant l'inoculation. La figure 2 montre que la perte de poids est proportionnelle à la dose de l'agent infectieux, suggérant que la gravité de la maladie est fonction de la dose injectée.

c) RECHERCHE DE L'AGENT INFECTIEUX DANS LE LIQUIDE PÉRITONÉAL. — A partir du deuxième jour après l'infection, les inclusions apparaissent dans les macrophages de l'exsudat. Le nombre de cellules

parasitées augmente du deuxième au cinquième jour et varie avec la dose de l'inoculum utilisé. Nous retrouvons dans les macrophages péritonéaux les différents stades du cycle de développement de l'agent : corps initiaux (pl. I, fig. 2), inclusions de corps élémentaires, lyse cellulaire avec libération des éléments infectieux (pl. I, fig. 3). Il existe donc une multiplication *in situ* du microbe. Au douzième jour, nous ne mettons plus en évidence l'agent de l'ornithose dans

Tableau I.

Dilutions de l'inoculum	Temps après l'inoculation		
	2e jour	5e jour	7e jour
0	21 %	†	0
1/10	5,6 %	0	0
1/100	2,7 %	3,5 %	0
1/1.000	1,2 %	3 %	0
1/10.000	0	1,2 %	0

les cellules sur les frottis colorés par la technique de May Grünwald Giemsa. Le tableau I montre les variations du pourcentage de macrophages parasités dans l'exsudat péritonéal de souris en fonction de la dose inoculée.

II. Etude clinique de la maladie consécutive a la réinoculation

Les souris survivant au vingt-cinquième jour, ont été considérées comme cliniquement guéries. Nous avons retenu comme critères de guérison l'augmentation du poids des animaux et les résultats négatifs de la recherche du germe sur les frottis d'exsudat péritonéal.

Quinze animaux guéris ont été réinoculés avec 0,5 ml d'une suspension non diluée qui, à la même dose, entraîne la mort de 70 p. 100 des animaux neufs.

L'évolution de la maladie est alors tout à fait différente. Nous avons noté l'absence d'amaigrissement et de diarrhée, l'absence de mortalité, les résultats négatifs de la recherche des inclusions microbiennes sur les frottis d'exsudat péritonéal.

Ces résultats préliminaires nous permettent donc d'affirmer l'existence d'un état d'immunité acquise qu'il importera d'analyser.

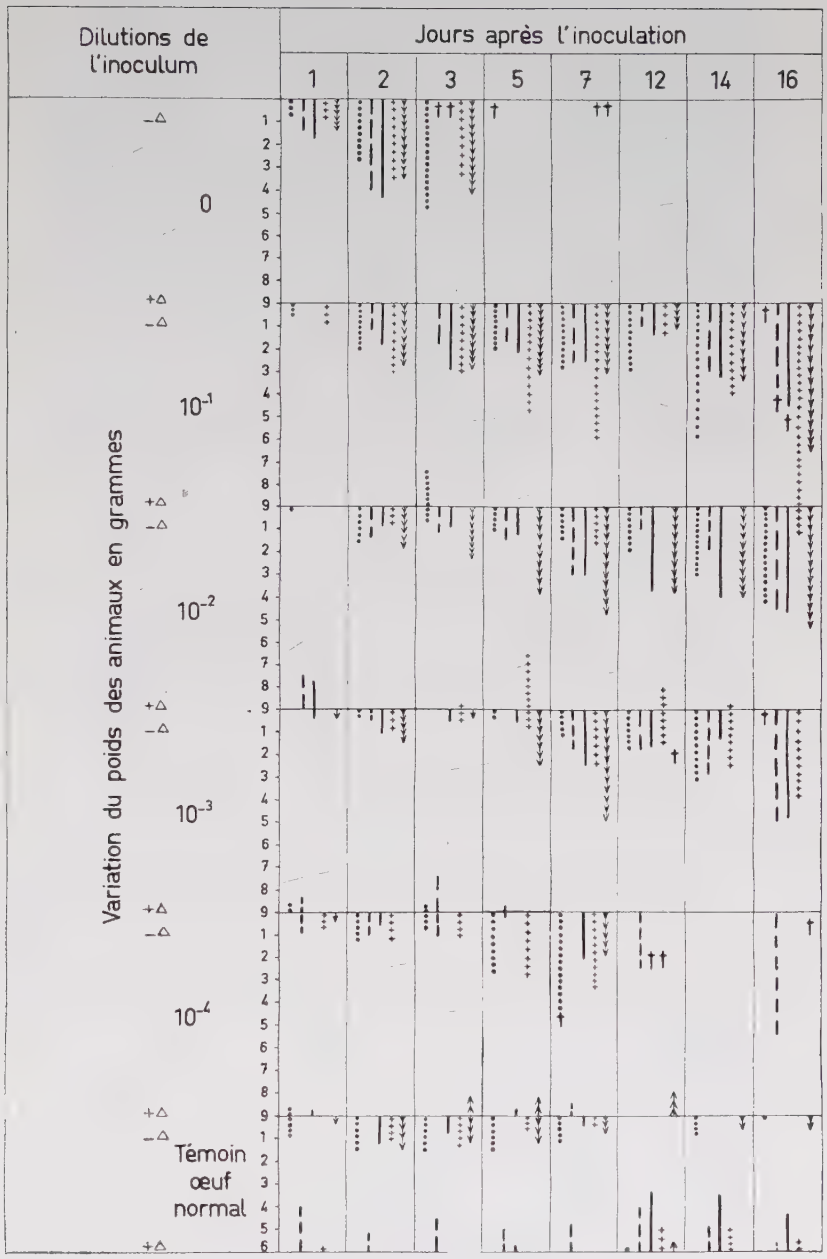

Dilutions de l'inoculum
Jours après l'inoculation
1
2
3
5
7
12
14
16
Variation du poids des animaux en grammes
0
10^{-1}
10^{-2}
10^{-3}
10^{-4}
Témoin œuf normal

FIG. 2.

III. Etude sérologique

a) Lors de la primo-inoculation, les résultats obtenus sur l'ensemble des animaux sont résumés sur le tableau II et l'histogramme suivant (fig. 3). L'étude des anticorps n'a pu être réalisée que sur 100 souris, les 87 autres étant mortes avant le premier prélèvement.

Les réactions de déviation du complément sont restées négatives dans 55 p. 100 des cas pour les autres animaux ; l'apparition des anticorps survient entre le quatrième et le cinquième jour après l'infection et le titre atteint, dans quelques cas, 1/320.

Il ne semble pas exister de corrélation entre l'apparition des anticorps et la guérison spontanée : en effet, nous avons noté, d'une part,

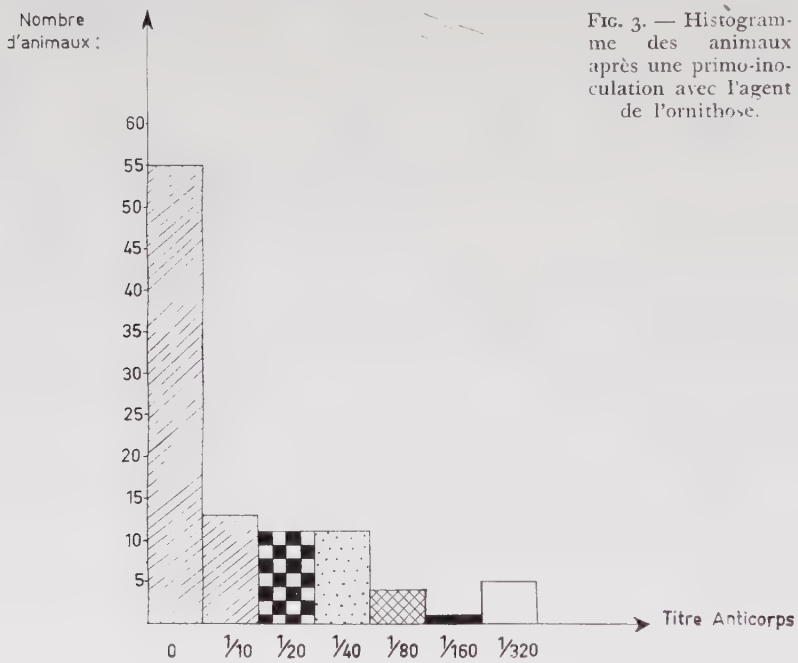


Fig. 3. — Histogramme des animaux après une primo-inoculation avec l'agent de l'ornithose.

Légende de la planche

Fig. 1. — Microtitrateur de Takatsy : dilution simultanée de huit sérums différents.

Fig. 2. — Début du cycle de l'agent de l'ornithose à l'intérieur de macrophages péritonéaux.

Fig. 3. — Stade terminal : inclusion diffuse.

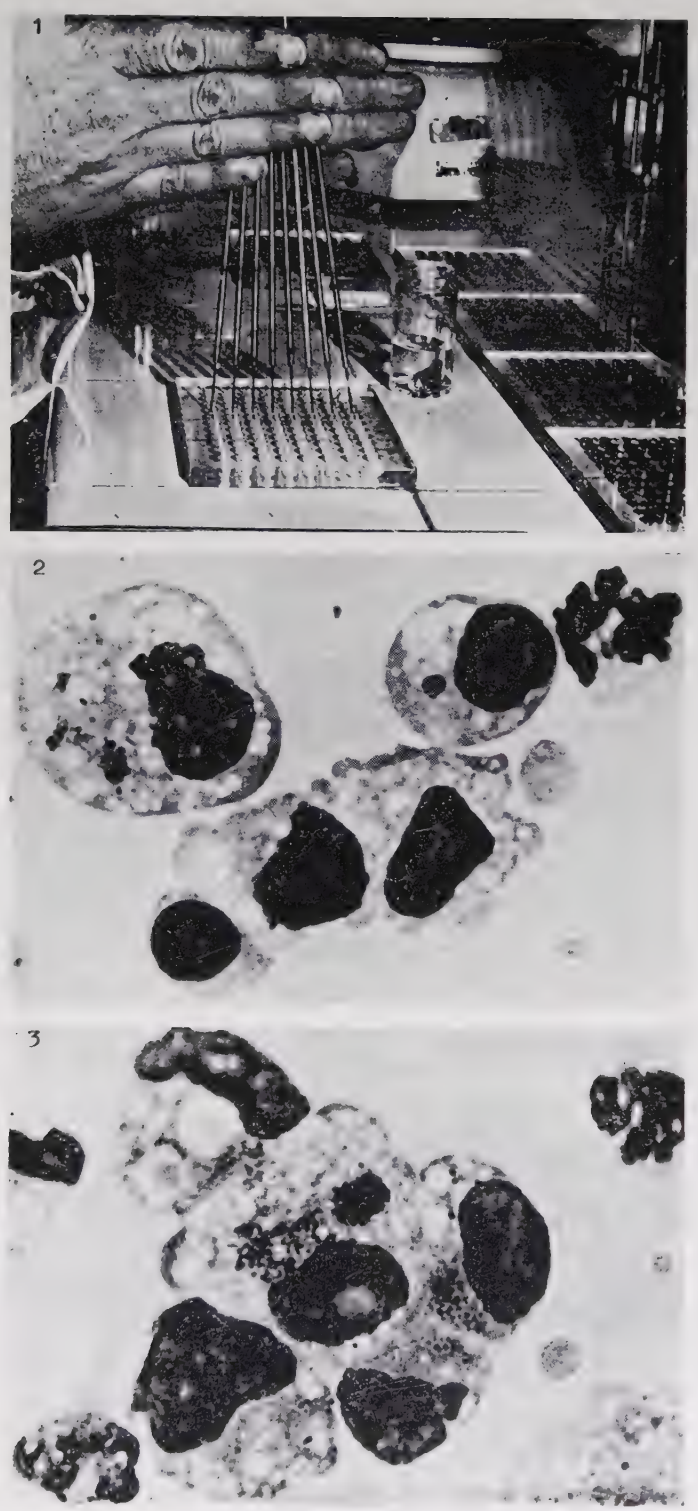


PLANCHE I.

Tableau II.

Titre des anticorps sériques	Nombre de jours après l'inoculation avec l'agent de l'ornithose														Nombre total d'animaux
	3	4	5	6	7	8	//	13	14	15	16	//	19	//	22	
1/320								2		3						5
1/160								1								1
1/80		1						2							1	4
1/40		1	1	2				2		1	2				2	11
1/20			2	4				3		2						11
1/10			3					3		3	4					13
0	5	14	1	1	16	11		1		4	1				1	55

l'absence d'anticorps chez des animaux résistants, d'autre part, un taux s'élevant jusqu'au 1/320 dans le sérum prélevé le jour même de la mort.

b) Après une deuxième inoculation, la production d'anticorps est d'emblée plus élevée pour l'ensemble des animaux ; toutefois le titre n'excède jamais 1/320.

Les réinoculations n'entraînent pas d'augmentation importante des anticorps.

Une série comportant cinq inoculations successives a permis d'étudier plus précisément la dynamique des anticorps (fig. 4).

Les anticorps augmentent d'abord régulièrement, puis le titre reste le même ou bien décroît, en dépit des stimulations répétées. Dans certains cas, nous avons effectué la réaction de fixation du complément sur les liquides péritonéaux de ces animaux et nous avons décelé des taux d'anticorps s'élevant jusqu'au 1/160. Les différences de taux entre sérum et liquide d'ascite ne sont pas significatives. Les résultats obtenus au treizième jour de la maladie dans le liquide péritonéal et dans le sérum sont exprimés dans le tableau III.

Des souris témoins ont reçu en injection intrapéritonéale, 0,5 ml d'une suspension de sac vitellin d'œuf normal embryonné préparée

Tableau III.

Animaux	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6	N° 7
Sérum	1/20	1/10	1/80	1/80	1/320	1/320	1/160
Exsudat péritonéal	1/40	1/40	1/80	1/20	1/40	1/40	1/160

selon le même procédé que l'inoculum de l'agent infectieux. Les réactions avec l'antigène spécifique ont montré que les sérums de ces animaux témoins étaient parfois positifs, le titre pouvant atteindre 1/80, mais ne dépassant pas cette valeur après plusieurs inoculations.

Ce fait a déjà été signalé par Terzin [**10**] qui envisage l'existence d'une communauté antigénique entre les agents du groupe et les constituants du sac jaune normal.

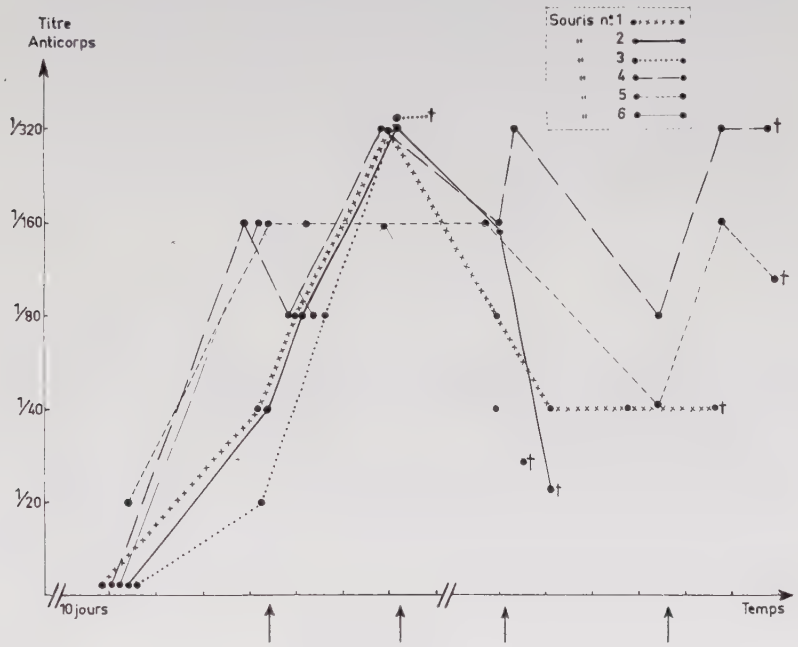


Fig. 4.

CONCLUSION

Des animaux inoculés par voie intrapéritonéale avec l'agent de l'ornithose présentent une maladie dont la sévérité est fonction de la dose. Les signes cliniques : ascite, amaigrissement, diarrhée sont les mêmes que ceux qu'ont décrits Rivers et Berry [**8**] chez la souris infectée de la même façon par l'agent de la psittacose.

La réinoculation d'animaux guéris nous a montré qu'il existait une résistance acquise qui s'affirme au cours des inoculations successives. Cet état d'immunité paraît plus net que celui qu'on obtient

avec l'agent de la psittacose. Pour Rivers, en effet, toutes les souris guéries d'une première atteinte succombent à une réinoculation. En revanche, Yanamura et Meyer [11] ont affirmé que des souris résistaient à une seconde agression par des doses faibles ou moyennes d'agent infectieux. Les résultats de la recherche du titrage des anticorps présents dans le sang et dans le liquide d'ascite soulignent la faiblesse de la réponse immunologique de la souris. Malgré la multiplication intracellulaire importante de l'agent infectieux et sa libération, peu d'anticorps sont élaborés, et nous n'avons obtenu que dans 5 cas sur 100 un taux égal à 1/320. Il ne semble pas exister de corrélation entre le taux des anticorps et l'état de résistance de la souris, puisque la guérison ne s'accompagne pas toujours d'un taux décelable d'anticorps. Rappelons que, chez l'homme, une atteinte par l'agent de l'ornithose entraîne l'apparition d'anticorps déviant le complément. Leur augmentation est rapide ; ils atteignent un taux élevé, de l'ordre de 1/1 250. Ces résultats posent le problème de la nature des mécanismes de l'immunité chez la souris.

SUMMARY

Mice, when inoculated in the peritoneal cavity with ornithosis agent, develop a disease whose severity is related to the doses. The clinical features are : ascitis, loss of weight, diarrhea.

Complement fixation tests were performed during the disease. As a rule, there is no significant increase of the antibody titer. In 5 p. 100 of the cases, the titer was 1/320. There is no correlation between the titer and the animal's resistance to one or several reinoculations. This results underline the problems of the mecanisms of immunity in mince.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Bedson (S. P). A study of experimental immunity to the virus of psittacosis in the mouse, with special reference to persistence of infection. *Brit. J. exp. Path.*, 1938, **19**, 353-360.

[2] Burnet (F. M.). Enzootic psittacosis amongst wild australian parrots. *J. Hyg.*, 1935, **35**, 412-420.

[3] Furness (G.), Graham (D. M.) and Reeve (P.). The titration of trachoma and inclusion blennorrhoea viruses in cell cultures. *J. gen. Microbiol.*, 1960, **23**, 613-619.

[4] Hornus (G.) Psittacose pulmonaire expérimentale de la souris blanche. *Ann. Inst. Pasteur*, 1940, **64**, 97-116.

[5] Krumwiede (C.), McGrath (M.) and Oldenbusch (C.). The etiology of the disease psittacosis. *Science*, 1930, **71**, 262-263.

[6] Meyer (K. F.) and Eddie (B.). Latent psittacosis infections in mice. *Proc. Soc. exp. Med.*, 1933, **30**, 483-484.

[7] Orfila (J.) et Lepinay (A.). Etude du cycle de développement de l'agent de l'ornithose dans les macrophages de souris. *Ann. Inst. Pasteur*, 1967, **113**, 19-27.

[8] Rivers (T. M.), Berry (G. P.) and Sprunt (D. H.). Psittacosis. II. Experimentally induced infections in mice. *J. exp. Med.*, 1931, **54**, 105-118.

[9] Sever (J. L.). Application of a microtechnique to viral serological investigations. *J. Immunol.* 1962, **88**, 320-329.

[10] Terzin (A. L.), Vedros (N. A.) and Dressler (H. R.). Studies on a common bedsonia group antigen (CBA) found in the yolk of hen's eggs. *J. Immunol.*, 1964. **92**, 665-672.

[11] Yanamura (H. Y.) Meyer (K. F.). Active immunity to the microbacterium multiforme psittacosis in the mouse. *J. Immunol.*, 1942, **44**, 195-209.

ÉTUDE EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE DU DÉVELOPPEMENT ET DE LA MORPHOLOGIE DE *CHLAMYDIA PSITTACI* DANS LES MACROPHAGES DE SOURIS

PAR

A. LÉPINAY, J. ORFILA, A. ANTEUNIS, J.M. BOUTRY, L. ORME-ROSELLI et R. ROBINEAUX

Imprimé avec le périodique « *Annales de l'Institut Pasteur* ».
(N° d'ordre 4474. — Extrait Août 1970. — Tome **119**, pp. 222-231.)

ETUDE EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE DU DÉVELOPPEMENT ET DE LA MORPHOLOGIE DE *CHLAMYDIA PSITTACI* DANS LES MACROPHAGES DE SOURIS (*)

par A. LÉPINAY (**), J. ORFILA, A. ANTEUNIS, J. M. BOUTRY, L. ORME-ROSELLI et R. ROBINEAUX

(Service de Microbiologie, Faculté de Médecine d'Amiens et Service de Physiopathologie Cellulaire, I. N. S. E. R. M., Hôpital Saint-Antoine, Paris)

SUMMARY

The developmental cycle, within mouse macrophages of *Chlamydia psittaci* has been studied by electron microscopy. Six hours after infection, the only particles visible within the host cytoplasm are intermediate bodies and initial bodies. The elementary body has thus suffered profound changes soon after its entry into the cell. Between the 6 th and 24 th hour, the majority of the intra-vacuolar parasite population consists of initial bodies. A few fissionary forms are observed.

The change from initial body to intermediate body is characterized by the appearance of a central nucleoid. At the 72 nd hour post-infection, elementary bodies are abundant and show 3 distinct areas : an eccentric but homogenous composite accumulation of a number of heterogenous granules and an electron-dense zone of 150 Å particles resembling in size and morphology particle of RNA.

***

Key words : Chlamydia psittaci. Macrophages.

INTRODUCTION

Les microorganismes du groupe Psittacose-Trachome-Lymphogranulomatose vénérienne, présentent un cycle de développement intracellulaire complexe au cours duquel se forment des éléments de taille et d'affinités tinctoriales différentes.

Les travaux antérieurs, ceux d'Erlandson et d'Allen [**8**] sur la structure de l'agent de la Méningopneumonie, ceux d'Armstrong et Reed [**3**] sur l'agent de la Lymphogranulomatose vénérienne, et en particulier ceux d'Anderson et coll. [**2**] sur l'agent de l'Ornithose ont bien montré l'existence

(*) Manuscrit reçu le 13 décembre 1969.

(**) Le présent travail fait partie d'une thèse de Doctorat d'Etat ès-sciences (Université de Paris-6e).

de trois types de particules apparaissant au cours de l'infection : le corps initial, le corps intermédiaire, le corps élémentaire. Mais il est difficile d'établir la chronologie de l'apparition de ces différentes formes à l'intérieur des cellules parasitées. Ce problème a été abordé pourtant, pour l'agent du Trachome par Mitsui, Fujimoto, Kajima [**11**], pour l'agent de la Lymphogranulomatose par Armstrong, Valentine et Fildes [**4**].

Pour mieux connaître la nature de ces agents infectieux et comprendre leur évolution, nous avons étudié l'ultrastructure de l'un d'entre eux, celui de l'Ornithose, lors de sa multiplication *in vitro,* dans différents systèmes cellulaires et en particulier dans les macrophages péritonéaux de souris IC. C'est de ces cellules dont il sera essentiellement question ici. Elles ont été choisies en raison de leur rôle dans la physiopathologie de la maladie expérimentale de la souris blanche [**14**].

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1° Souche :

La souche de *Chlamydia psittaci* provient de l'Institut d'Hygiène de l'Université d'Amsterdam. Elle est entretenue au Laboratoire par passages sur œufs de poule embryonnés. Nous avons employé deux inoculums différents :

a) L'un vient directement d'un broyat de sac vitellin très richement infecté, dont le contrôle sur frottis est fait par la coloration de Castañeda, et dont le titre a été déterminé sur œuf de poule : la LD_{50} est de 10^{-7}.

b) L'autre est une suspension de *Chlamydia psittaci* provenant de cellules HeLa infectées, la souche ayant été préalablement adaptée à partir de sac vitellin sur des cellules HeLa par trois ou quatre passages successifs. Les particules ainsi débarrassées de débris vitellins, sont libérées des cellules infectées, après chaque passage, par les ultrasons à la 96e h de l'infection. Le dernier inoculum est une préparation qui ne contient donc aucun matériel lipidique provenant du jaune d'œuf. Le titre de la souche est déterminé sur œuf de poule : la LD_{50} est de $10^{-4,5}$. Le nombre de particules infectieuses contenues dans l'inoculum provenant du sac vitellin (S.I.V.), ou du produit de passage sur culture (I.C.H.) est apprécié sur cellules infectées après 48 heures.

2° Obtention et inoculation des macrophages :

Les cellules sont obtenues par lavage de la cavité péritonéale de souris femelle de souche IC, selon une technique décrite précédemment [**13**]. Dès le prélèvement, les cellules sont réparties dans des flacons de 60 ml, à la concentration de $4,5 \times 10^5$ cellules/ml. A la 6e h de culture, alors que les macrophages sont étalés et adhèrent à la surface du verre, les cellules sont lavées avec précaution, remises à l'étuve à 37° C en présence de milieu semi-synthétique de Parker 199 (Institut Pasteur, Paris) additionné de 10 p. 100 de sérum de veau et de 50 μg/ml de streptomycine. Après 48 h de culture, le milieu est rejeté et les macrophages sont recouverts pendant une heure à 37°, par la quantité convenable d'inoculum : l'inoculum provenant des passages en cellules HeLa est utilisé pur, l'inoculum vitellin est dilué de façon à obtenir dans tous les cas, environ une inclusion pour dix cellules. Après une heure de contact à 37°, l'excès d'inoculum est rejeté, les cultures sont lavées puis recouvertes de 8 ml de milieu d'entretien : il est identique au milieu de culture, mais la proportion de sérum de veau a été réduite

à 5 p. 100. Parallèlement, on prépare deux séries de témoins, à partir de la même culture : l'une reçoit une suspension de sac vitellin non infecté puis le milieu d'entretien, l'autre le milieu d'entretien normal.

3° Prélèvement et fixation des cellules pour l'étude ultrastructurale :

A des temps variables après l'inoculation (6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h), les cellules sont lavées au PBS et fixées :

Fixation : in situ à + 4°, glutaraldéhyde 1,5 p. 100 en tampon Millonig sans sucrose à pH = 7,4 pendant 1 h. Rinçage en tampon Millonig sans sucrose pendant une nuit. Le matériel cellulaire obtenu après grattage de la paroi de verre est recueilli par centrifugation à 1 000 t/mn pendant 10 mn puis postfixé au tétroxyde d'osmium à 2 p. 100 en tampon Millonig sans sucrose pendant 30 mn.

Deshydratation à l'alcool Merck : 70° deux fois 5 mn (+ 4°) ; 90° deux fois 5 mn (+ 4°) ; absolu trois fois 20 mn (température ambiante).

Imprégnations et inclusions (température ambiante) : propylène oxyde, deux fois 7 mn 1/2 ; mélange d'Epon complet à 50 p. 100 dans le propylène oxyde 1 h. Epon complet dégazé sous vide, (2 parties du mélange *A*, 1 partie du mélange *B*) ; mise en capsule et polymérisation, 72 h à 60°.

Coupes au diamant à l'Ultratome I LKB, recueillies sur grilles électrolytiques mesh 300 de diamètre 32 mm, sans film support.

Coloration double : 30 mn d'acétate d'uranyl alcoolique à 2,5 p. 100 (50 p. 100 d'une solution aqueuse à 5 p. 100, 50 p. 100 d'alcool absolu). Cette coloration est suivie d'un rinçage à l'eau bidistillée. Dix minutes de citrate de plomb, selon Reynolds, suivies de deux rinçages dans une solution de soude 0,02 N et dans l'eau bidistillée.

Film de carbone : côté coupe.

Microscopie : Elmiskop I Siemens, 80 K volts, double condensateur, diaphragme condenseur 400 μ, diaphragme objectif 50 ou 30 μ. Pièce polaire 40 000.

Photographies : plaques Scientia Gevaert 23 D 50, développées en Promicrol au 1/3 dans l'eau désionisée, pendant 12,5 mn à 20° C.

RÉSULTATS

A. — Structure du macrophage non infecté en culture

L'étude ultrastructurale du macrophage péritonéal de souris en culture a déjà été faite par différents auteurs, en particulier par Cohn et coll. [**5, 6**].

Après 54 h de culture, le cytoplasme de ces macrophages normaux cultivés *in vitro* possède une ultrastructure dépendant des conditions de culture, en particulier de l'origine et de la concentration du sérum de veau employé [**6**].

Dans les conditions où nous avons travaillé, à 10 p. 100 et 5 p. 100 de sérum, on peut décrire ainsi ces cellules ; leur cytoplasme montre des mitochondries nombreuses, généralement de petite taille, à crêtes bien dessinées, avec une matrice assez dense. Le système ribosomal cytoplasmique est représenté par des ribosomes libres, des rosettes *small polysomes* et plus rarement par quelques structures hélicoïdales de type *large polysomes* [**16**]. L'ergastoplasme est rarement abondant, plus souvent limité à quelques

lamelles disséminées. Fréquemment apparaissent de larges corps lipidiques refoulant certaines structures comme les lamelles ergastoplasmiques qui se moulent sur leur convexité. Le pourtour cytoplasmique comporte de très nombreux replis, traduisant la présence de membranes ondulantes. Les vésicules de pinocytose sont nombreuses. Il faut noter également la présence de replis linéaires de la membrane cellulaire prenant dans le cytoplasme un aspect plus ou moins contourné, débouchant parfois sur de grandes vacuoles irrégulières. L'appareil de Golgi est très développé. Le nombre des différents types de vésicules donne une image fonctionnelle d'un appareil vacuolaire particulièrement important. Les corps denses, *dense bodies,* sont très nombreux, de structure homogène finement granuleuse, entourés d'une *unit membrane.* Les phagosomes sont peu abondants. Après quelques jours de survie *in vitro* (78 h) la structure des macrophages n'est pas profondément modifiée, à l'exception de l'appareil lysosomal particulièrement développé (pl. I).

B. — Structure du macrophage infecté par *Chlamydia psittaci* a la 72e h de l'infection

A la 72e h de l'infection les cellules hôtes sont fortement parasitées. C'est le stade terminal du premier cycle de développement de l'agent infectieux. Le plus souvent, le cytoplasme très étalé du macrophage présente plusieurs inclusions ; dans quelques cas, rares, une seule inclusion de grande taille (pl. II) occupe une grande partie de la cellule, respectant le noyau, l'appareil de Golgi et une mince couronne de cytoplasme. Cette vacuole d'inclusion est limitée par une membrane simple apparemment discontinue selon les incidences qu'elle offre à la coupe. Elle est souvent bordée par de nombreuses mitochondries presque au contact de la membrane. Elle montre dans un espace vide de tout organite cellulaire, trois types d'éléments arrondis ou ovalaires, de taille et de structures diverses :

1° *Les corps élémentaires :* (pl. III, fig. 1)

Il s'agit de particules de 300 à 350 mμ de diamètre ; ils sont nettement délimités par une membrane externe du type *unit membrane,* constituée par deux feuillets de 25 Å denses aux électrons séparés par un espace clair d'environ 30 Å. Dans la grande majorité des cas, la membrane externe limite un corps élémentaire presque parfaitement sphérique. On peut cependant trouver des images plus irrégulières. Cette membrane est parfois séparée du contenu du corps élémentaire par un espace clair irrégulier. Il existe également une membrane interne mais elle est difficilement visible dans les présentes conditions de fixation, n'apparaissant qu'en certains points de son pourtour. On observe dans les corps élémentaires une masse homogène et compacte excentrée : le nucléoïde. Il est entouré par une zone homogène dense aux électrons dans laquelle se trouvent des grains de 150 Å s'apparentant par leur taille et par leur composition [9] à des grains de ribonucléoprotéines (RNP). De plus on y rencontre parfois une formation composite de plusieurs granulations hétérogènes jusqu'à huit sur une seule section, chacune mesure 220 Å environ : cette formation est elle-même cons-

tituée de sous-unités de 40 à 45 Å : nous avons montré [9] qu'il s'agit là de glycogène. Les corps élémentaires, abondants, occupent généralement le centre de la vacuole.

2° *Les corps initiaux :* (pl. III, fig. 2).

Ils se distinguent complètement des corps élémentaires, ce sont des structures plus grandes, arrondies de 0,550 à 1 μ de diamètre environ. Ils sont cernés par deux *unit membranes,* concentriques, légèrement sinueuses. Ces deux membranes sont séparées l'une de l'autre par un espace clair plus ou moins large d'environ 100 Å. On ne remarque pas de condensation centrale, au contraire le corps initial possède une structure relativement lâche où sont bien visibles, au centre, des filaments de 20 Å, organisés en réseau irrégulier et probablement faits d'ADN, et à la périphérie une zone plus dense aux électrons dans laquelle se distinguent des grains dont la taille est voisine de 150 Å. Certains corps initiaux plus allongés, dépassant 1 μ présentent un étranglement médian. A la 72e h de l'infection cellulaire les corps initiaux sont peu nombreux et situés au pourtour de la vacuole.

3° *Les corps intermédiaires :* (pl. III, fig. 3).

Un troisième type de particules est présent à l'intérieur de la vacuole d'inclusion : le corps intermédiaire. Il est sphérique, lui aussi limité par deux jeux de membrane ; son diamètre de 450 mμ, se situe entre ceux du corps initial et du corps élémentaire ; sa structure comprend un nucléoïde central qui semble se développer en relation avec les structures fibrillaires visibles à sa périphérie. Le diamètre de ces fibrilles est le même que celui des filaments décrits dans le corps initial. A la périphérie on retrouve, plus dense, la structure du corps initial.

4° On trouve disséminés entre les différentes particules des éléments de taille variable, en moyenne de 50 mμ, sphériques ou ovoïdes, généralement clairs aux électrons, bordés d'une *unit membrane.* Ces éléments sont parfois accolés aux trois types de particules. Ils proviennent peut-être de la membrane limitant la vacuole pour les plus volumineux d'entre eux (pl. II) et pourraient aussi, pour les plus petits, venir de la membrane externe des corps initiaux (pl. III, fig. 4).

C. — Chronologie du développement

Nous l'avons étudié dans les deux types de cultures, inoculées, soit avec une suspension de particules infectantes provenant de cellules HeLa parasitées, soit avec un inoculum provenant de sac vitellin infecté.

Six heures après l'inoculation, quel que soit l'inoculum, les images obtenues sont identiques. Les surfaces cellulaires présentent de nombreuses membranes ondulantes, témoins d'une intense activité endocytaire. Cependant nous n'avons pas mis en évidence à la surface des cellules de particule libre ou en voie de pénétration. La majorité des cellules examinées ne semblent pas parasitées. A l'intérieur de certaines d'entre elles on rencontre des corps intermédiaires ou des corps initiaux isolés au sein du cytoplasme et entourés d'une membrane vacuolaire (pl. IV, fig. 1). Très rarement ils

sont groupés à l'intérieur d'une seule vacuole bordée d'une *unit membrane* souvent irrégulière. On peut penser que les vacuoles développées autour de chaque corps phagocyté, ont conflué en une vacuole unique dont la membrane se moule sur le contour des particules. Nous avons trouvé une disposition des particules, en couronne, autour de l'appareil de Golgi. Elle nous semble intéressante car elle permet d'imaginer le cheminement des particules entrées simultanément en plusieurs points de la surface cellulaire, conformément au schéma de la migration des vacuoles de pinocytose. Nous en donnons un exemple dans une image de réinfection, après un premier cycle où trois corps initiaux entourés chacun de leur microvacuole sont au contact du Golgi (pl. IV, fig. 2).

Le seul examen des lamelles, prélevées à la 6e h de l'infection et colorées au May-Grümwald-Giemsa, ne permet pas d'identifier de particules microbiennes au sein de la cellule-hôte. Ces dernières ne sont révélées que par la microscopie électronique.

A la 24e heure : Le parasitisme est beaucoup plus important qu'à la 6e h. Les images obtenues sont différentes suivant l'inoculum utilisé :

a) Avec un inoculum provenant de cellules parasitées (I.C.H.) dont nous devrons discuter du degré d'infectiosité, seuls sont présents les corps initiaux ; ils sont rassemblés en nombre variable, 5 à 7 sur une coupe. Les vacuoles primitives entourant chaque élément s'anastomosent entre elles, constituant un système « alvéolaire » communiquant ; ils forment une préinclusion (pl. V).

Lorsque le nombre des éléments est plus élevé, de l'ordre d'une quinzaine, l'ensemble des corps initiaux se trouve réuni dans une grande vacuole unique. La majorité des corps initiaux sont de taille identique et de forme sphérique. Cependant des structures allongées apparaissent présentant une constriction médiane suggérant l'existence d'une fission binaire.

b) Avec un inoculum provenant de sac vitellin (S.I.V.) les particules de *Chlamydia psittaci* sont presque toutes déjà rassemblées à l'intérieur d'une vacuole unique, (pl. VI). On dénombre des corps initiaux en grande quantité, alors que les corps intermédiaires sont beaucoup plus rares, pour un corps intermédiaire, on trouve en moyenne 15 corps initiaux. A ce stade les corps élémentaires sont exceptionnels. Les images de fission binaire de corps initiaux sont plus nombreuses que dans les cellules de culture I.C.H.

La vacuole d'inclusion est toujours bien séparée du cytoplasme par une membrane simple, coupée parfois tangentiellement selon les incidences.

A ce moment là, avec les deux types d'inoculum, les colorations au May-Grümwald-Giemsa donnent des images de morula et d'inclusions typiques colorées en violet, alors qu'à la 6e heure, comme nous l'avons vu, aucune identification n'est possible par cette méthode.

A la 48e heure : Il existe plusieurs vacuoles de taille variable mais contenant les trois types de particules. Les corps initiaux sont en position périphérique. Certains d'entre eux (pl. VII) présentent une légère constriction centrale (fig. 1) d'autres semblent en voie de séparation (fig. 2), enfin certains paraissent complètement divisés et chaque élément-fille possède son double système de membrane bien individualisé (fig. 3.).

Les corps intermédiaires sont en petit nombre et les corps élémentaires sont maintenant plus nombreux qu'eux.

A la 72e heure : A ce stade, les corps initiaux sont toujours nombreux et en position externe fréquemment enclavés dans des logettes périphériques.

Les vacuoles-inclusions sont le plus souvent multiples et certaines d'entre elles se rompent à l'extérieur de la cellule et répandent leur contenu dans le milieu de culture.

DISCUSSION

De nombreux auteurs ont étudié en microscopie électronique le développement des agents du groupe PLT. Il est important de souligner que les travaux ont porté sur divers agents de ce groupe : trachome-lymphogranulomatose-ornithose-psittacose parasitant des cellules-hôtes différentes. Les techniques d'inoculation, de culture et de fixation variant avec les auteurs, il devient très difficile de comparer entre eux les résultats. Nous avons à notre tour, abordé l'étude de quelques problèmes fondamentaux :

1° Pénétration des particules :

L'intense activité de membranes du macrophage est sans doute à la base du mécanisme de pénétration du germe dans la cellule. Cependant, nous n'avons trouvé aucune image ultrastructurale pouvant préciser ce mécanisme. On sait seulement que les corps initiaux et les corps intermédiaires isolés au sein du cytoplasme à la 6e *h* de l'infection sont toujours entourés d'une membrane vacuolaire.

2° Devenir des particules infectieuses :

L'inoculum est constitué de l'ensemble des trois particules sans qu'on puisse affirmer qu'elles possèdent le même pouvoir d'invasion. Podolyan et coll. [**15**] pensent que dès la première heure, les corps élémentaires de *Chlamydia psittaci* subissent des modifications ultrastructurales importantes : désintégration du nucléoïde et disparition de la membrane. Le premier stade que nous avons étudié se situant à la 6e h après l'infection, il est un peu tard pour préciser les transformations qui surviennent dès l'entrée des particules infectieuses à l'intérieur de la cellule-hôte. Nous pouvons cependant affirmer que les développements après six heures se font à partir d'un stade où l'on ne rencontre que des corps initiaux et de rares corps intermédiaires.

L'étude des tout premiers stades fera l'objet d'un travail séparé.

3° Reproduction de ces microorganismes :

Podolyan et coll [**15**], Mitsui [**11**] ont signalé dans les premières étapes du cycle des Chlamydiae la présence d'une matrice réticulée dans les cellules parasitées. Cette matrice donnerait naissance aux corps initiaux après néoformation de membranes selon un schéma rappelant celui décrit par Dales et Siminovitch [**7**] pour la vaccine. Nous n'avons pas trouvé de matrice comparable et les différents examens ont montré des particules bien définies entourées de leur membrane et conservant toujours leur individualité. Cette divergence dans la description des premiers stades des Chlamydiae provient probablement d'artéfacts de fixation comme l'ont signalé d'ailleurs Armstrong et Reed [**3**] étudiant l'agent de la lymphogranulomatose vénérienne.

Certains corps initiaux se présentent sous forme d'haltères bien qu'on observe rarement des images de division. Avec la majorité des auteurs [**2, 3, 4, 8, 11**] qui ont étudié le cycle de développement des agents du groupe PLT, nous pensons que de telles images sont suggestives de l'existence d'une division par fission binaire. Nous n'avons, en revanche, jamais rencontré dans les macrophages de telles images de division pour les corps intermédiaires ou les corps élémentaires, ce qui diffère des conclusions avancées par Anderson [**2**] en ce qui concerne *C. psittaci* parasitant des cellules épithéliales. Cependant, il est possible de trouver côte à côte deux corps intermédiaires de même taille et de même structure évoquant deux cellules-filles. De plus, lorsque *C. psittaci* parasite une cellule HeLa, on peut (pl. VIII) trouver des corps intermédiaires à deux nucléoïdes au milieu d'autres particules, dont des corps initiaux plus volumineux que dans le système macrophage. Il est, d'après ces faits, important de souligner le rôle éventuel joué par la cellule-hôte : les caractères morphologiques pouvant varier selon qu'il s'agit de macrophages, de cellules HeLa ou de fibroblastes.

Il paraît certain comme il a été démontré pour d'autres agents du même groupe [**2, 10, 12**] que seul le corps élémentaire est infectieux. Les corps initiaux et peut-être les corps intermédiaires, s'ils sont endocytés, ce qui n'est pas encore démontré, devraient être détruits dès leur pénétration. Nous avons montré ailleurs [**9**] que la composition de la membrane des corps élémentaires est différente de celle des corps initiaux et intermédiaires : elle contient des mucopolysaccharides ; elle pourrait donc présenter une résistance particulière aux enzymes digestifs de la cellule-hôte. L'étude approfondie des tout premiers stades de l'infection, l'obtention d'inoculums homogènes faits d'un seul type de particules, l'utilisation de thymidine et d'uridine marquées permettront de répondre sans doute à ces questions.

Le cycle complexe de développement pourrait être résumé ainsi :

Six heures après l'infection, les seules particules visibles dans le cytoplasme de la cellule-hôte sont des corps intermédiaires et des corps initiaux. Le corps élémentaire, particule infectieuse, a donc, dès sa pénétration, subi des modifications profondes.

Vingt-quatre heures après l'infection, les corps initiaux étant beaucoup plus nombreux et constituant la quasi-totalité de la population (90 à 95 p. 100) de l'inclusion il est nécessaire qu'entre la 6^{e} h et la 24^{e} h, les corps initiaux se soient divisés.

Nous n'avons actuellement aucune idée ni de la durée d'un cycle de division, ni du nombre de cycles que subit le corps initial avant de se transformer en corps intermédiaire.

Si on considère le nombre de granules RNP qui entre dans la constitution d'une particule on note que le nombre de ces granules est d'environ 30 par section moyenne de corps élémentaire ; ce nombre est assez constant. Dans les corps initiaux, chaque section moyenne comporte environ 50 granules RNP. Compte tenu du volume de cette dernière particule le nombre des granules dans les corps initiaux est donc beaucoup plus important : il faut admettre alors une synthèse de ces éléments. Elle ne peut se faire qu'à partir de l'ADN issu du nucléoïde du corps élémentaire entré dans la cellule.

La transformation ultérieure du corps initial en corps intermédiaire est caractérisée par l'apparition d'un nucléoïde central, probablement fait de filaments d'ADN synthétisés et regroupés. Les corps intermédiaires se transforment dans le macrophage en corps élémentaires de taille plus réduite, comprenant les trois zones distinctes que nous avons illustrées (pl. III, fig. 1 et 3).

Ces différentes particules ont jusqu'alors été caractérisées principalement par leur taille. Il nous semble qu'un meilleur critère d'identification de ces différents stades soit leur ultrastructure.

RÉSUMÉ

Le cycle du développement de *Chlamydia psittaci* est étudié à l'intérieur de macrophages de souris en microscopie électronique. Les seules particules visibles dans le cytoplasme de la cellule-hôte 6 heures après l'infection, sont des corps intermédiaires et des corps initiaux. Le corps élémentaire a donc, dès sa pénétration, subi des modifications profondes. Entre la 6e et la 24e heure, les corps initiaux constituent la majorité de la population parasite intra-vacuolaire. Quelques figures de division sont rencontrées.

La transformation du corps initial en corps intermédiaire est caractérisée par l'apparition d'un nucloïde central. Les corps élémentaires sont nombreux à la 72e heure de l'infection et présentent trois zones distinctes : une masse homogène compacte, excentrée ; une formation composite formée de plusieurs granulations hétérogènes ; une troisième, dense aux électrons, renfermant des grains de 150 Å s'apparentant par leur taille et leur composition à des grains de ribonucléoprotéines.

***

Mots clés : Chlamydia psittaci. Macrophages.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Allison (A. C.), Harington (J. C.) and Birbeck (M.). An examination of the cytotoxic effects of silica on macrophages. *J. exp. Med.*, 1966, **124**, n° 2, 141-154.

[2] Anderson (D. R.), Hopps (H. E.), Barile (M. F.) and Bernheim (B. C.). Comparison of the ultrastructure of several rickettsiae, ornithosis virus, and mycoplasma in tissue culture. *J. Bact.*, 1965, **90**, n° 5, 1387-1404.

[3] Armstrong (J. A.) and Reed (S. E.). Nature and origin of initial bodies in lymphogranuloma venereum. *Nature*, 1964, **201**, 4917, 371-373.

[4] Armstrong (J. A.), Valentine (R. C.) and Fildes (C.). Structure and replication of the trachoma agent in cell cultures as shown by electron microscopy. *J. gen. Microbiol.*, 1963, **30**, 59-73.

[5] Cohn (Z. A.), Hirsch (J. G.) and Fedorko (M. E.). The *in vitro* differentiation of mononuclear phagocytes. — IV. The ultrastructure of macrophage differentiation in the peritoneal cavity and in culture. *J. exp. Med.*, 1966, **123**, n° 4, 747-757.

[6] Cohn (Z. A.) and Parks (E.). The regulation of pinocytosis in mouse macrophages. — IV. The immunological induction of pinocytic vesicles secondary lysosomes and hydrolytic enzymes. *J. exp. Med.*, 1967, **125**, n° 6, 1092-1104.

[7] Dales (S.) and Siminovitch (L.). The development of vaccinia virus in Earle's strain cells as examined by electron microscopy. *J. Biophy. Biochem. Cytol.*, 1961, **10**, 475-503.

[8] Erlandson (R. A.) and Allen (E. G.). The ultrastructure of meningopneumonitis. *Virology*, 1964, **22**, 410-418.

[9] Lépinay (A.), Anteunis (A.), Orfila (J.) et Robineaux (R.). Etude morphologique et cytochimique ultrastructurale de l'agent de l'Ornithose cultivé dans les macrophages péritonéaux de souris. Communication au Colloque franco-suisse de Microscopie électronique de Lausanne, 19-21 juin 1969.

[10] Manire (G. P.) and Tamura (A.). Preparation and chemical composition of the cell walls of nature infectious dense forms of meningopneumonitis organisms. *J. Bact.*, 1967, **94**, 1178-1183.

[11] Mitsui (Y.), Fujimoto (M.) and Kajima (M.). Development and morphology of Trachoma agent in the yolk sac as revealed by electron microscopy. *Virology*, 1964, **23**, 30-45.

[12] Moulder (J. W.). The Psittacosis group as bacteria. 1964, John Willy and Sons Inc-NY.

[13] Orfila (J.) et Lépinay (A.). Etude du cycle de développement de l'agent de l'Ornithose dans les macrophages de souris. *Ann. Inst. Pasteur*, 1967, **113**, 19-27.

[14] Orfila (J.) et Lépinay (A.). Etude de l'Ornithose expérimentale de la souris blanche infectée par voie intrapéritonéale. *Ann. Inst. Pasteur*, 1969, **116**, 111-120.

[15] Podolyan (V. Y.), Milyutin (U. N.), Gudima (O. S.) and Lykima (R. N.). Morphogenesis of ornithosis virus. *Voprovy Virusol.*, 1964, **9**, n° 2, 208-212.

[16] Shelton (E.) and Kuff (E. L.). Substructure and configuration of ribosome isolated from mammalian cells. *J. mol. Biol.*, 1966, **22**, 23-31.

Imprimé par l'Ancienne Imprimerie de la Cour d'Appel, 1, rue Cassette à Paris (France).
Printed in France. (71497)

Archiv für die gesamte Virusforschung 33, 271—280 (1971)
© by Springer-Verlag 1971

Ultrastructure et Cytochimie ultrastructurale des membranes de Chlamydia Psittaci[1]

Par

A. Lepinay[2], R. Robineaux[3], J. Orfila[2], L. Orme-Rosselli[3] et J. M. Boutry[3]

Avec la collaboration de A. Bernier

Avec 11 Figures

Reçu le 22 Juillet 1970

Résumé

L'étude ultrastructurale des membranes de Chlamydia psittaci au cours de son développement intracellulaire dépend des fixateurs utilisés.

Avec le fixateur de Ryter et Kellenberger il apparaît que les trois particules (initial, intermédiaire, élémentaire) possèdent deux jeux de «unit membranes». La réaction de mise en évidence des polysaccharides selon Seligmann et Thiery souligne la différence de composition chimique des membranes des diverses particules. La membrane interne du corps élémentaire possède des polysaccharides alors que celles du corps initial et du corps intermédiaire en sont dépourvues.

Summary

Ultrastructure and Cytochemistry of Chlamydia Psittaci

The ultrastructural appearance of membranes of Chlamydia psittaci, during its extracellular development depends upon the fixatives employed.

Using the Ryter and Kellenberger fixative, it appears that the three developing particles possess two "unit membranes". With the method of Seligmann and Thiery polysaccharides are demonstrated and the difference of chemical composition of membranes of diverse particles is stressed. The internal membrane of elementary bodies possess polysaccharides whereas the initial and intermediary bodies lack polysaccharides.

1. Introduction

L'étude en microscopie électronique du cycle de développement intra-cellulaire de l'agent de l'Ornithose permet d'identifier trois types de particules: le corps initial, le corps intermédiaire, le corps élémentaire (7).

[1] Cette publication est destinée à accompagner une thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences (Université Paris).

[2] Chaire de Bactériologie, Virologie, Immunologie de la Faculté de Médecine d'Amiens. 80 Amiens, France.

[3] Service de Physio-pathologie Cellulaire (Inserm-U-104, Association Claude Bernard, ERA-CNRS no 193), Hôpital Saint-Antoine — Paris XII^{e}, France.

Nous nous sommes attachés dans ce travail à préciser l'ultrastructure des membranes de ces éléments microbiens en comparant d'une part les résultats obtenus à l'aide de deux fixateurs différents et en utilisant d'autre part les techniques de mise en évidence des polysaccharides (16) et des glycoprotéides (13) en microscopie électronique.

2. Materiel et méthodes

2.1. Souche d'Ornithose[1]

Il s'agit de la souche d'Ornithose précédemment décrite (11) et entretenue par passages successifs sur œufs de poule embryonnés de 5 jours.

Nous avons fixé la suspension provenant d'un broyat de sac vitellin infecté et des macrophages péritonéaux de souris, après 72 heures d'infection «*in vitro*».

2.2. Types de fixation

2.2.1. La fixation à la Glutaraldéhyde

A 1,80% en tampon monodiphosphate selon Millonig à pH = 7,4, pendant une heure; rinçages en tampon Millonig pendant douze heures puis post-fixation en acide osmique à 1%.

2.2.2. La fixation selon Ryter et Kellenberger (14)

Préfixation de 15 minutes en acide osmique à 0,1% dans le milieu de culture puis fixation douze heures à la température de la pièce dans le fixateur de Kellenberger pH = 6,1 (acide osmique à 1% dans un tampon acétate véronal additionné de chlorure de calcium 0,01 M). Après un rinçage en tampon acétate véronal, une post-fixation avec une solution d'acétate d'uranyl à 0,5% en tampon véronal est effectuée pendant une heure avant la suite des opérations:

Deshydratation à l'alcool (Merck): 70° deux fois 5 minutes (+4°) — 90° deux fois 5 minutes (+4°) — absolu trois fois 20 minutes (température ambiante).

Imprégnations: Propylène oxyde, deux fois 7½ minutes (température ambiante).

Inclusions: a) *Epon.* Une heure du mélange d'épon complet à 50% dans le propylène oxyde (2 parties du mélange A, une partie du mélange B) — mise en capsule dans l'épon complet dégazé sous vide — polymérisation pendant 72 heures à 60°.

b) *Glycol-méthacrylate.* Préparé selon LEDUC et BERNHARD (6) pour l'application de la technique de RAMBOURG de mise en évidence des glycoprotéides.

Coupes effectuées au diamant à l'ultrotome I L.K.B. et recueillies sur grilles électrolytiques «Mesh 300» de 32 mm de diamètre sans film support, ou utilisées en coupes flottantes pour effectuer le test de SELIGMANN modifié par THIERY (polysaccharides) (16) ou le test de RAMBOURG (glycoprotéides) (13).

Colorations doubles: 30 minutes d'acétate d'uranyl alcoolique à 2,5% (une partie d'une solution aqueuse à 5%, une partie d'alcool absolu) — 10 minutes de citrate de plomb, selon REYNOLDS, suivies de deux rinçages dans une solution de soude 0,02 M et dans l'eau bidistillée — film de carbone.

2.3. Test de Seligmann modifié par Thiery

10 minutes d'acide périodique à 1% dans l'eau distillée suivies de plusieurs rinçages à l'eau distillée — 20 minutes de thiosemicarbazine à 1% dans l'acide acétique à 10% — lavages avec des solutions d'acide acétique de concentrations décroissantes 10%, 5%, 2%, puis en eau distillée — protéinate d'argent à 1% dans l'eau distillée pendant 40 minutes pour la mise en évidence des polysaccharides simples et 24 heures pour celle des mucopolysaccharides — montage sur grille sans autre coloration —

[1] Cette souche isolée d'un pigeon atteint d'Ornithose nous a été aimablement fournie par le Professeur DEKKING de l'Université d'Amsterdam.

solution d'amylase à 0,5% dans un tampon Sörensen à pH = 7,2 additionné de ClNa à 0,1 M pour les épreuves de digestion enzymatique du glycogène — montage sur grilles: films de carbone sans autre coloration.

2.4. Test de Rambourg

Coupes flottantes pendant 15 minutes, 30 minutes et une heure sur une solution à 1% d'acide phosphotungstique dans l'acide chlorhydrique à 10% (13) — rinçage rapide à l'eau distillée — montage sur grille, sans autre coloration.

2.5. Microscopie

Elmiskop I Siemens, 80 Kvolts, double condensateur, diaphragme condenseur 400, diaphragme objectif 50 ou 30 μ. Pièce polaire 40000.

2.6. Photographies

Plaques Gevaert Scientia 23D50, développées en Promicol au 1/3 dans l'eau désionisée, pendant 12 mn 1/2 à 20°C.

3. Resultats

3.1. La fixation à la Glutaraldéhyde

Après fixation, le corps élémentaire apparaît comme une particule sphérique de 300 à 350 mμ de diamètre (Pl. I, Fig. 4). Il est délimité par une membrane externe du type «unit membrane» de 100 Å constituée de deux feuillets d'environ 35 Å séparés par un espace clair d'environ 30 Å. La Membrane externe est séparée du contenu central plus dense de la particule par une zone de densité moyenne.

Une membrane interne existe, mais elle est difficilement visible, n'apparaissant qu'en certains points du pourtour du contenu central. Le corps initial (Pl. I, Fig. 1) plus grand de 0,550 à 1 μ de diamètre environ est cerné de deux «unit membranes» concentriques, légèrement sinueuses et toujours visibles. Elles sont généralement espacées par une zone claire régulière. Chaque «unit membrane» paraît plus fine que dans le corps élémentaire, elle ne dépasse guère 70 Å d'épaisseur. Quant au corps intermédiaire de taille plus petite que le corps initial (0,450 μ environ) il possède également un jeu de deux «unit membranes» très visibles, séparées l'une de l'autre par un espace clair. L'épaisseur de chaque «unit membrane» se situe entre celle du corps initial, 70 Å, et celle du corps élémentaire 100 Å.

3.2. La fixation selon Ryter et Kellenberger

Celle-ci confirme et précise les résultats précédents à l'exception de l'l'épaisseur des membranes qui paraît identique quel que soit le type de particule (Pl. II). Elle permet d'obtenir un meilleur contraste des membranes. Les corps élémentaires apparaissen ici toujours limités par deux «unit membranes très distinctes. Nous avons, avec cette fixation, parfois noté pour certains corps élémentaires la présence de membranes spiralées rappelant les images décrites par Erlandson et Allen (3) pour l'agent de la méningopneumonie (Pl. II, Fig. 3).

Ainsi le corps élémentaire paraît bien posséder le même nombre de membrane que les autres particules ce qui n'apparaît pas clairement après double fixation glutaraldéhyde-acide osmique.

L'existence d'une variabilité de la membrane interne entre le corps initial et le corps élémentaire selon la fixation utilisée implique l'existence probable d'une différence de composition de cette membrane au cours de l'évolution du

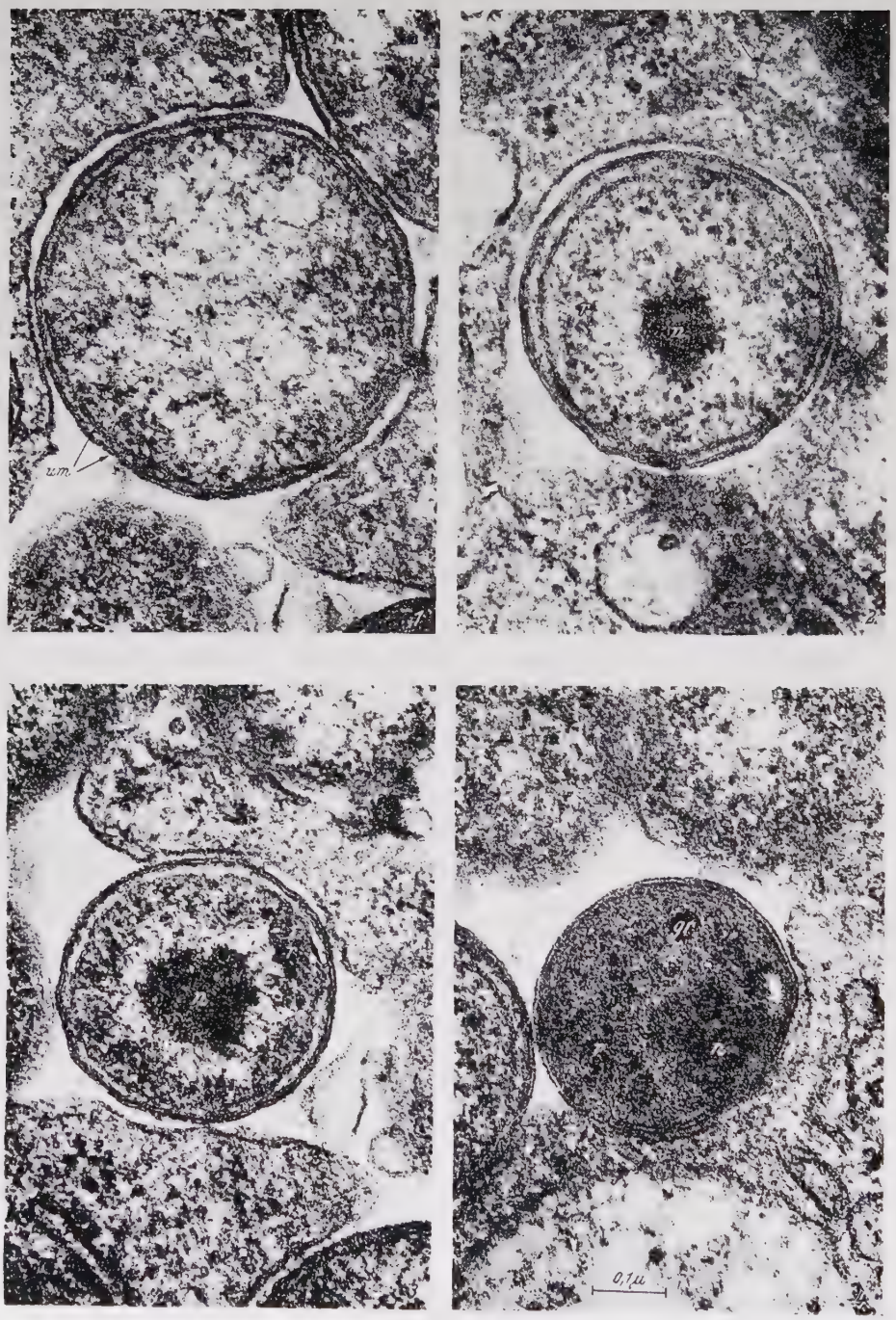
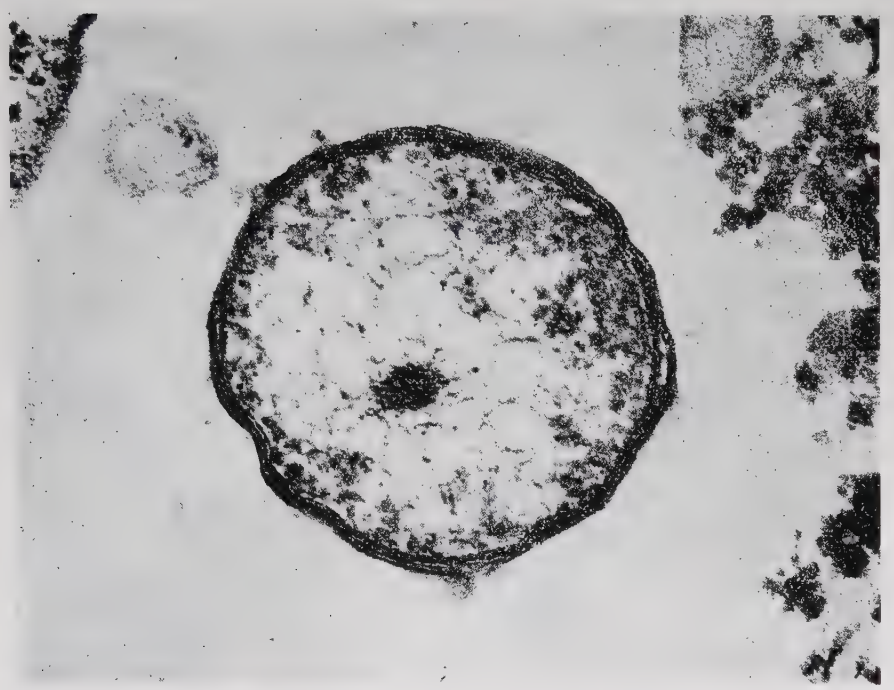


Planche I

Particules de l'agent de l'Ornithose après fixation glutaraldéhyde-acide osmique.
Fig. 1. Corps initial, noter les deux «unit membranes» (u.m.)
Fig. 2. Corps intermédiaires à deux stades
Fig. 3. Différents d'évolution (n: nucléoïde, r: ribosomes)
Fig. 4. Corps élémentaire (n: nucléoïde, r: ribosomes, gr: articule de polysaccharides). Il est à noter que la membrane interne n'est pas visible



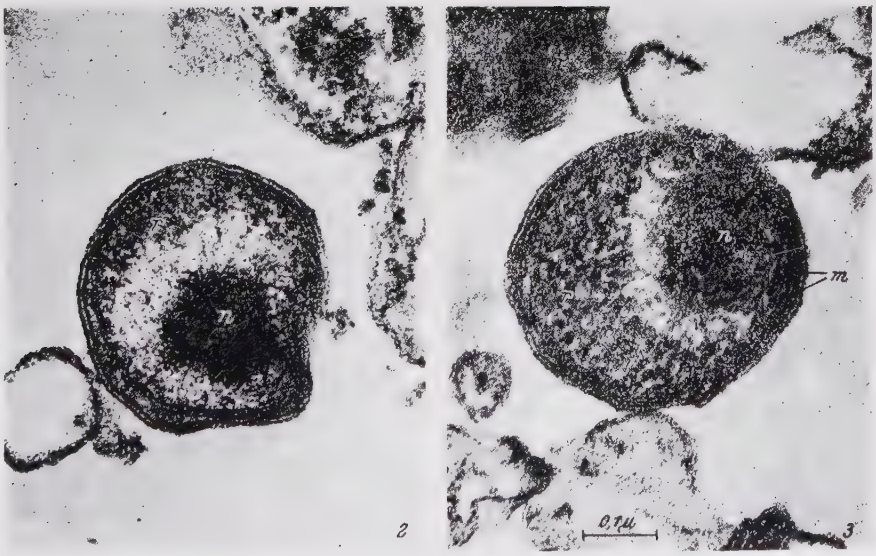


Planche II

Particules de l'agent de l'Ornithose après fixation Kellenberger-Ryter.

Fig. 1. Corps initial: noter les filaments d'ADN organisés en réseau

Fig. 2 et Fig. 3. Corps élémentaires (n: nucléoïde, r: ribosomes, m: replis de membrane)

corps initial vers le corps élémentaire. C'est pourquoi nous avons appliqué à ces membranes les techniques de mise en évidence des polysaccharides et des glycoprotéides.

3.3. Mise en évidence des polysaccharides par la technique de Seligmann et Thiery

Après un temps réduit d'incubation par la thiosemicarbazine (35 minutes) la réponse est pratiquement négative (Pl. III, Fig. 1). Nous notons seulement la présence à l'intérieur de la particule de grosses granulations hétérogènes, jusqu'à 8 sur une section, mesurant approximativement 220 Å et chacune formée de sous-unités de 40 à 45 Å environ. Les préparations soumises à l'action de l'alpha-amylase préalablement testée quant à son activité spécifique ne montre qu'une digestion très partielle et inconstante de ces granulations (Pl. III, Fig. 2 et 3).

Après 24 heures d'incubation par la thiosemicarbazine, les membranes du corps initial et du corps intermédiaire présentent une très légère densification; celles du corps élémentaire apparaîssent fortement colorées. En particulier la membrane interne est marquée par une bande sombre de 100 à 200 Å d'épaisseur (Pl. IV).

Il existe donc au cours de la formation puis de la maturation du corps élémentaire une charge en polysaccharides au niveau des membranes de ce corps élémentaire. Elle paraît plus importante au niveau de la «unit membrane» interne et ne dépasse jamais le feuillet interne de la «unit membrane» externe; elle peut remplir complètement l'espace compris entre les deux «unit membranes».

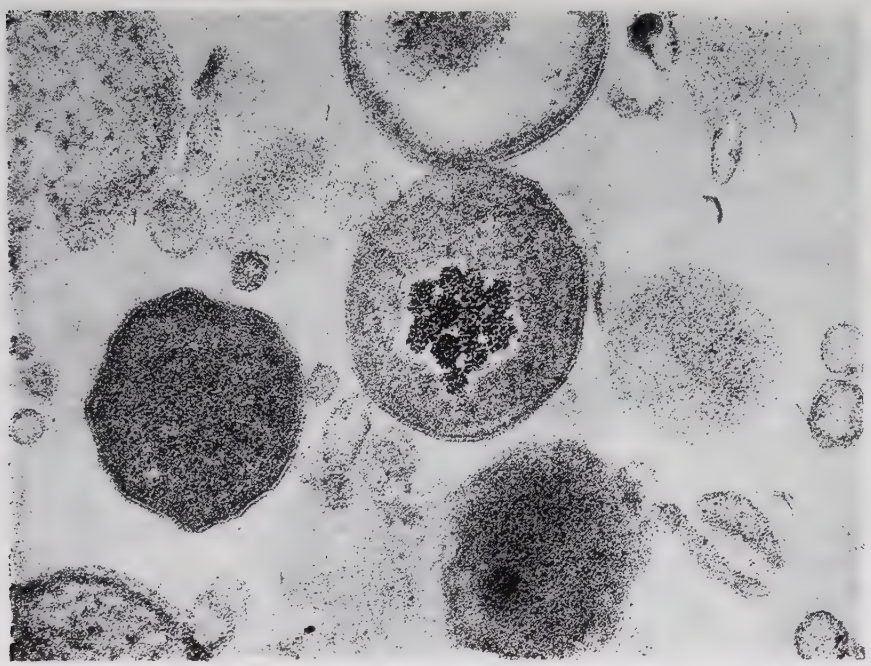
Avec la technique de Rambourg nous obtenons également une réaction positive au niveau des membranes du corps élémentaire avec les mêmes particularités et une coloration plus intense sur la «unit membrane» interne.

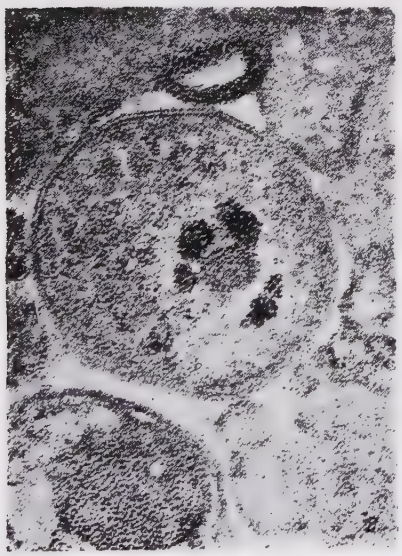
4. Discussion

Si pour d'autres membres du groupe des Chlamydiaceae les résultats ultrastructuraux précisent que les corps initiaux et intermédiaires sont limités par deux «unit membranes» les avis divergent en ce qui concerne le corps élémentaire, particule infectieuse. En effet Mitsui *et coll.* (9) pour l'agent du Trachome, Erlandson et Allen (3) pour celui de la méningo-pneumonie et Jadin pour l'ornithose (4) signalent l'existence d'une seule «unit membrane». Par contre Armstrong et Reed (1) pour l'agent de la lymphogranulomatose vénérienne et Anderson (2) pour l'Ornithose ont montré qu'il existait une membrane plasmatique interne, difficile à mettre en évidence par les fixateurs utilisés.

Il apparaît que le choix du fixateur est important. Ainsi avec la technique de Ryter et Kellenberger nous précisons pour le corps élémentaire la présence d'une membrane interne dont la structure est celle d'une «unit membrane» et dont l'épaisseur est légèrement plus grande que celle de la membrane interne du corps initial. Pour l'agent de la «tick borne fever» Tuomi (17) avait aussi remarqué une différence d'épaisseur entre les enveloppes des «larges» et des «petites» particules des rickettsies appelées ainsi par analogie avec les agents du groupe PLT.

Nous notons également sur ces mêmes préparations l'existence de plusieurs repliements de membrane issus semble-t-il de la membrane plasmatique. Peut être s'agit-il de mésosomes. Nous ne les rencontrons pas dans les corps initiaux





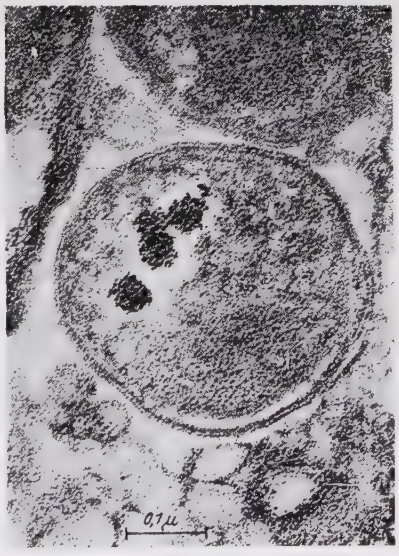


Planche III

Fig. 1. Corps élémentaires. Réaction de Seligmann et Thiery, après 35 min. d'incubation avec la Thiosemicarbazine: la réaction est négative au niveau des membranes. Noter la présence de grosses particules hétérogènes dans le corps élémentaire

Fig. 2 et Fig. 3. Corps élémentaires. Réaction de Seligmann et Thiery, après action de l'alpha-amylase. La digestion des grosses particules n'est que partielle

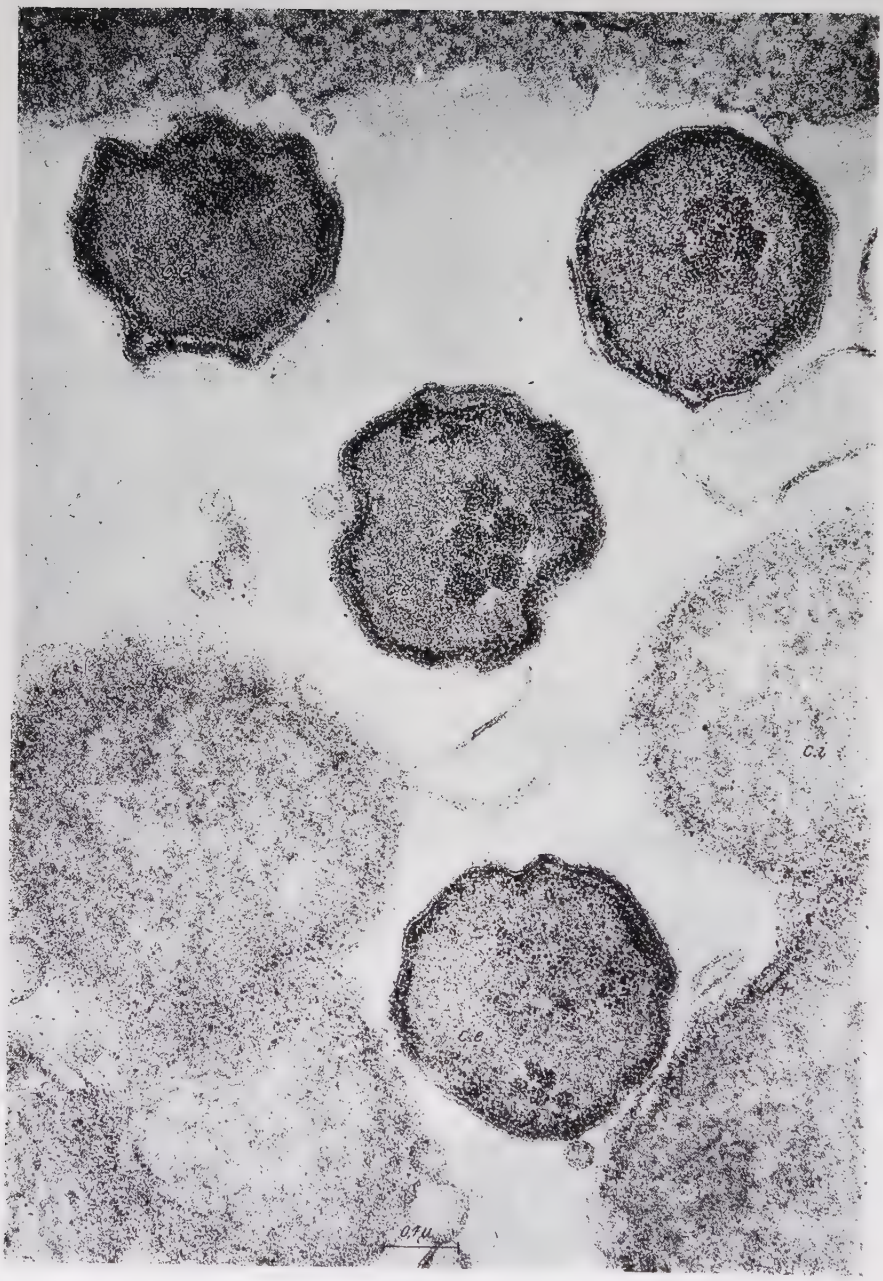


Planche IV

Réaction de Seligmann et Thiery après 24 heures d'incubation avec la Thiosemicarbazine.
L'«Unit Membrane» interne du corps élémentaire (c.e.) présente une réaction fortement positive, alors qu'elle était négative après 35 minutes (Pl. III, Fig. 1).
Le corps initial (c.i.) montre une réaction très légèrement positive (+).

contrairement aux résultats obtenus par ERLANDSON et ALLEN (3) pour la méningopneumonie. Par contre elles peuvent être observées avec la fixation de Ryter et Kellenberger dans les corps élémentaires.

La variation de densité de cette seconde membrane interne selon les fixations utilisées permet de supposer l'existence d'une différence de composition chimique entre les enveloppes internes des particules. En effet PERKINS et ALLISON (12) soulignaient que le corps élémentaire des agents du groupe PLT acquiert au cours de sa maturation une paroi rigide que ne possède pas le corps initial. JENKIN (5) avait affirmé que les membranes de la particule élémentaire de la méningopneumonie contenaient de l'acide muramique.

ERLANDSON et ALLEN (3) ont même supposé que l'acide muramique était localisé dans la zone claire adjacente à la «unit membrane». Pourtant les études biochimiques récentes de TAMURA et MANIRE sur des préparations purifiées de corps initiaux (15) et de corps élémentaires (8) de la méningopneumonie ont précisé la nature biochimique des constituants membranaires. Ils ne contiennent ni acide muramique ni acide diaminopimélique. La glucosamine et la galactosamine ne sont représentées que dans les membranes du corps élémentaire. Aucune étude biochimique de ce type n'a encore été entreprise pour l'agent de l'Ornithose.

La présence de polysaccharides tels que nous les avons révélés par le test de SELIGMANN et de THIERY (16) fait apparaître très nettement cette différence de composition chimique des membranes au cours du développement du corps élémentaire de l'agent de l'ornithose. Au cours de son cycle et tardivement l'agent infectieux se charge en polysaccharides localisés sur la face externe de la membrane interne. Toutefois nous ne pouvons actuellement préciser la nature exacte de ce polysaccharide. Ce critère de la localisation des polysaccharides entre les deux «unit membranes» du corps élémentaire seul, correspondrait ainsi au schéma de la paroi de certaines bactéries à Gram négatif, selon MURRAY (10). On sait que Chlamydia psittaci, membre du groupe PLT est un agent à Gram négatif.

Bibliographie

1. ARMSTRONG, J. A., and S. E. REED: Nature and origin of initial bodies in Lymphogranuloma venereum. Nature (Lond.) **4917**, 371—373 (1964).
2. ANDERSON, D. R., M. E. HOPPS, M. F. BARILE, and B. C. BERNHEIM: Comparaison of the ultrastructure of several rickettsieae ornithosis virus, and mycoplasma in tissue culture. J. Bact. **90**, 1387—1404 (1965).
3. ERLANDSON, R. A., and E. G. ALLEN: The ultrastructure of meningopneumonitis. Virology **22**, 410—418 (1964).
4. JADIN, J. M., J. CREEMERS et J. JADIN: Contribution à l'étude de l'ultrastructure de l'agent rickettsien de l'ornithose observé dans les cellules de l'épithelium pulmonaire de souris infectées expérimentalement. Bull. Soc. Path. exot. **62**, 303—311 (1969).
5. JENKIN, H. M.: Preparation and properties of cells walls of the agent of meningopneumonitis. J. Bact. **80**, 639—647 (1960).
6. LEDUC, E. H., and W. BERNHARD: Recent modifications of the glycol methacrylate embedding procedure. J. Ultrastruct. Res. **19**, 196—199 (1967).
7. LEPINAY, A., J. ORFILA, A. ANTEUNIS, J. M. BOUTRY, L. ORME-ROSSELLI et R. ROBINEAUX: Etude en microscopie électronique du développement et de la morphologie de l'agent de l'ornithose dans les macrophages de souris. Ann. Inst. Pasteur **119**, 1970 (sous presse).

8. MANIRE, G. P., and A. TAMURA: Preparation and chemical composition of the cell walls of mature infectious dense forms of meningopneumonitis organisms. J. Bact. **94,** 1178—1183 (1967).
9. MITSUI, Y., M. FUJIMOTO, and M. KAJIMA: Development and morphology of trachoma agent in the yolk sac cell as revealed by electron microscopy. Virology **23,** 30—45 (1964).
10. MURRAY, R. G. E., P. STEED, and H. E. ELSON: The localization of the mucopeptides in sections of the cell wall of Escherichia coli and other gram negative bacteria. Canad. J. Microbiol. **11,** 547—560 (1965).
11. ORFILA, J., et A. LEPINAY: Etude du cycle de développement de l'agent de l'ornithose dans les macrophages de souris. Ann. Inst. Pasteur **113,** 19—27 (1967).
12. PERKINS, M. R., and A. C. ALLISON: Cell wall constituents of rickettsial and psittacosis Lymphogranuloma organisms. J. gen. Microbiol. **30,** 469—480 (1963).
13. RAMBOURG, A.: Detection des glycoprotéines en microscopie électronique coloration de la surface cellulaire et de l'appareil de Golgi par un mélange acide chromique-phosphotungstique. C. R. Acad. Sci. (Paris) **265,** 1426—1428 (1967). Communication personnelle.
14. RYTER, A., et E. KELLENBERGER: Etude au microscope électronique de plasmas contenant de l'acide désoxyribonucléique. I. Les nucléoïdes des bactéries en croissance active. Z. Naturforsch. **13b,** 597—605 (1958).
15. TAMURA, A., and G. P. MANIRE: Preparation and chemical composition of the cell membranes of developmental reticulate forms of meningopneumonitis organisms. J. Bact. **94,** 1184—1188 (1967).
16. THIERY, J. P.: Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. J. Microscop. **6,** 987—1018 (1967).
17. TUOMI, J., and C. H. VON BONSDORFF: Electron microscopy of tick borne fever agent in bovine and ovine phagocytizing leukocytes. J. Bact. **92,** 1478—1492 (1966).

Adresses des Auteurs: Dr. R. ROBINEAUX, Service de Physio-pathologie Cellulaire, Hôpital Saint-Antoine, F-75 Paris XIIe, France — Mademoiselle AGNÈS LEPINAY, Chaire de Bactériologie, Virologie, Immunologie de la Faculté de Médicine d' Amiens, F-80 Amiens, France.

- Gendt - Freres Imp. Paris